

M^a Teresa Barroso Regueiras Silva Carvalho

Preparação de materiais de impressão molecular para fármacos e a sua aplicação em técnicas de extração miniaturizada lab-on-valve



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção
do grau de Mestre em Química*

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO

NOVEMBRO/2012

M^a Teresa Barroso Regueiras Silva Carvalho

Preparação de materiais de impressão molecular para fármacos e a sua aplicação em técnicas de extração miniaturizada lab-on-valve



*Tese submetida à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto para a obtenção
do grau de Mestre em Química*

Constituição do Júri da Prova de Mestrado

Presidente:

Alexandre Lopes Magalhães;

Vogais:

Aquiles Barros;

Manuel Azenha (Orientador);

Carlos Melo Pereira.

Aos meus pais, irmão e amigos...

Agradecimentos

Ao professor Manuel Azenha e à professora Marcela Segundo, pela orientação, compreensão e apoio dado ao longo de todo o trabalho;

À Porkodi pela cedência dos materiais de impressão molecular;

Ao professor Eduardo Marques e à professora Maria Clara Bastos que permitiram a utilização do Microscópio Ótico;

A todos os colegas de laboratório pelo bom ambiente de trabalho, em especial à Mariana e à Esther;

A todos os amigos e colegas de curso que me acompanharam ao longo desta etapa, com um agradecimento especial à Daniela, à Sara e à Susana pela paciência, amizade, e apoio constante;

Aos meus pais e ao meu irmão pelo apoio incondicional.

Resumo

Ao longo dos anos, a impressão molecular tem-se tornado uma abordagem amplamente usada para gerar recetores macromoleculares para a deteção de uma vasta gama de substâncias. A preparação de materiais de impressão molecular (MIMs) consiste na polimerização de monómeros funcionais na presença da molécula molde ou de uma molécula análoga. O processo inicia-se com a dissolução da molécula alvo, dos monómeros funcionais, dos agentes de entrelaçamento e do catalisador num solvente (também conhecido como agente porogénico). Os monómeros funcionais são escolhidos de modo a que possam interagir com a molécula molde e irão organizar-se em torno dela. As posições dos monómeros são fixadas numa posição que é “congelada” por co-polimerização do agente de entrelaçamento. Após a polimerização, a molécula molde é removida do polímero por extração, deixando cavidades capazes de se religar à molécula molde. No presente estudo usou-se como monómero funcional um líquido iónico com o catião imidazólio.

Um dos objetivos deste projeto é a obtenção de partículas de sílica de impressão molecular na forma esférica. Para isso combina-se a tecnologia sol-gel com técnicas de emulsão. A microestrutura das partículas é regulada pela escolha dos solventes, do tensioativo e dos parâmetros da reação sol-gel. Para síntese de partículas de forma esférica por emulsão água-em-óleo (W/O), foram efetuados estudos relativos à fase orgânica, no que diz respeito ao efeito de dois solventes (hexano e ciclohexano) no tamanho das partículas obtidas, usando como tensioativo o SPAN80. A variação da razão de volumes entre as fases orgânica e aquosa e concentração de tensioativo foram também estudados. O solvente escolhido para a preparação dos materiais em forma esférica, foi o ciclohexano com uma concentração de tensioativo de 0,05 g/L e uma razão de volumes W/O de 40. Nestas condições obtiveram-se partículas com tamanho médio maior dentro dos resultados de menor dispersão de tamanhos.

Para além, das partículas de forma esférica foram também preparadas partículas de forma irregular, em ambas foi usado como molécula molde o naproxeno. As partículas preparadas foram caracterizadas morfológicamente, quimicamente e foi avaliado o seu efeito de impressão molecular por extração SPE, sendo posteriormente aplicadas, as partículas que demonstraram seletividade (MIP A), na técnica de fluxo lab-on-valve (LOV). Foram também aplicadas à técnica LOV partículas de impressão molecular cedidas por outros membro do grupo de investigação (MIP 525 e MIP/NIP PF) e partículas comerciais (SupelMIP™ NSAIDs e OASIS™ HLB).

A aplicação das partículas obtidas em LOV, uma técnica recente e pouco explorada de miniaturização de processos de extração em fase sólida era o segundo objetivo do

projeto. O LOV é uma técnica de injeção em fluxo (FI), denominada como a terceira geração de análise por FI, trabalha no modo de injeção sequencial e permite a miniaturização de operações analíticas diminuindo a quantidade de amostra e reagente necessárias à análise.

À técnica LOV aplicou-se conceito de “*bead injection*” que permitiu a formação de microcolunas de extração no interior do sistema de fluxo. As microcolunas de extração foram empacotadas de forma automática, utilizando um passo de ressuspensão, antes da aspiração das partículas, para a fluidização das suspensões. As microcolunas obtidas tiveram massas entre 7 mg e 22 mg consoante o tipo de partículas utilizadas com valores de desvio padrão relativo desde 14% a 21%.

Palavras chave: impressão molecular; sol-gel; naproxeno; polimerização por emulsão (W/O); Materiais de impressão molecular; extração em fase sólida: lab-on-valve; bead injection

Abstract

Over the years, the molecular imprinting has become a widely used approach for generating macromolecular receptors for the detection of a wide range of substances. The preparation of materials of molecular imprinting (MIPs) consists in polymerizing of the functional monomers in the presence of a template molecule or an analog molecule. The process starts with the dissolution of the target molecule, of functional monomers, of crosslinkers and catalyst in a solvent (also known as porogenic agent). The functional monomers are selected so that they can interact with the template molecule and will arrange themselves around it. The positions of monomers are fixed in a position which is "frozen" by co-polymerization of the crosslinker. After polymerization, the template molecule is removed from the polymer by extraction, leaving cavities able to rebind to the template molecule. In this study was used as functional monomer an ionic liquid with the imidazolium cation.

One of the objectives of this project was to obtain silica particles of molecular imprinting in spherical form. For this reason, the sol-gel technology is combined with a technique of emulsion. The microstructure of the particles is governed by the choice of solvents, surfactant and parameters of the sol-gel reaction. For synthesis of spherical particles by emulsifying water-in-oil (W/O), studies were made on the organic phase, with respect to the effect of two solvents (hexane and cyclohexane) in particle size obtained using as surfactant the SPAN80. Change in volume ratio between the organic and aqueous phases and concentration of surfactant were also studied. The solvent chosen for the preparation of materials in spherical form was cyclohexane with a surfactant concentration of 0.05 g/mL and a volume ratio O/W 40. Under these conditions there were obtained particles with the largest average size within results of lesser dispersion size.

In addition of spherical particles there were also prepared particles of irregular shape, both were prepared using as template the naproxen molecules. The particles prepared were characterized morphologically, chemically and it was evaluated their molecular imprinting effect by SPE extraction, being subsequently applied to a flow technique, lab-on-valve (LOV), the particles that have demonstrated selectivity (MIP A), Were also applied to the technique LOV molecular imprinting particles prepared by other member of the research group (MIP 525 e MIP/NIP PF) and commercial particles (SupelMIPTM NSAIDs e OASISTM HLB).

The application of the obtained particulates in LOV, a recent and little explored technique of miniaturization of solid phase extraction processes was the second objective of the project. The LOV is a technique of flow injection (FI), known as the third generation of FI analysis, it works in sequential injection mode and enables the miniaturization of analytical operations by reducing the amount of sample and reagent needed for the analysis.

To the technique LOV was applied the "bead injection" which allowed the formation of microcolumns within the extraction flow system. The microcolumns were packed automatically, using a step of resuspension, prior to aspiration of the particles for the fluidization of suspensions. The microcolumns obtained had mass between 7 mg to 22 mg, depending on type of particle used with values of relative standard deviations from 14% to 21%.

Keywords: molecular imprinting; sol-gel; naproxen; emulsion polymerization (W / O);
Materials of molecular imprinting; solid phase extraction: lab-on-valve; bead injection

ÍNDICE

Agradecimentos	VII
Resumo	IX
Abstract	XI
ÍNDICE	XIII
Índice de figuras	XVII
Índice de tabelas.....	XXI
Lista de abreviaturas.....	XXIII
Capítulo 1	1
1 Introdução	1
1.1 Reconhecimento molecular	2
1.2 Impressão molecular	2
1.2.1 Impressão não covalente	3
1.2.2 Impressão covalente	4
1.2.3 Impressão semi-covalente	6
1.3 Preparação de materiais de impressão molecular	7
1.3.1 Molécula molde.....	7
1.3.2 Monómero funcional.....	8
1.3.3 Agente de entrelaçamento	9
1.3.4 Solvente.....	10
1.4 Impressão molecular em diferentes matrizes.....	11
1.4.1 Impressão molecular em matriz acrílica	11
1.4.2 Impressão molecular em matriz sol-gel	12
1.5 Processo sol-gel	13
1.5.1 Fatores que influenciam o processo pol-gel	15
1.5.1.1 pH.....	16
1.5.1.2 Solvente.....	17
1.5.1.3 Temperatura	17

1.5.1.4	Processo de envelhecimento (ou “aging”) e secagem do sol-gel.....	17
1.6	Formatos que os materiais de impressão molecular podem adquirir.....	18
1.6.1	Partículas irregulares	18
1.6.2	Membranas e filmes	19
1.6.3	Partículas de forma esférica.....	19
1.7	Polimerização por emulsão.....	21
1.7.1	Influência da fase oleosa.....	22
1.7.2	Influência da agitação	23
1.7.3	Influência da concentração de tensioativo	23
1.7.4	Razão água:óleo:tensioativo	24
1.8	Caracterização do polímero de impressão molecular	25
1.8.1	Caracterização química.....	25
1.8.2	Caracterização morfológica.....	26
1.8.3	Caracterização do comportamento de impressão molecular.	26
1.9	Âmbito do estudo.....	27
1.9.1	Parâmetros da impressão molecular	28
1.9.2	Moléculas usadas no estudo de eficiência	31
Capítulo 2	33
2	Técnicas de Aplicação	33
2.1	Extração em fase sólida (SPE)	35
2.2	Sistema de fluxo Lab-on-valve (LOV)	36
2.2.1	Análise por injeção em fluxo (FIA).....	36
2.2.2	Sistemas lab-on-valve	38
2.2.3	Sistemas lab-on-valve associado ao conceito de “bead injection”	39
2.2.4	Instrumentação lab-on-valve	40
Capítulo 3	43
3	Procedimento experimental	43
3.1	Material, reagentes e instrumentação	44
3.2	Síntese do monómero funcional ^[54]	45

3.3	Preparação de partículas esféricas de impressão molecular	46
3.3.1	Preparação de MIPs	47
3.3.2	Preparação de NIPs.....	48
3.4	Preparação de partículas irregulares de impressão molecular.....	48
3.4.1	Preparação de MIPs/NIPs.....	49
3.5	Lavagem das partículas de impressão molecular	49
3.6	Caracterização morfológica por Microscopia	50
3.7	Caracterização por FTIR - ATR	50
3.8	Caracterização por extração em fase sólida	50
3.9	Sedimentação das partículas de sílica sintetizadas	51
3.10	Aplicação das partículas na técnica de fluxo lab-on-valve.....	52
Capítulo 4		61
4	Resultados e discussão.....	61
4.1	Preparação de partículas de sílica de forma esférica	63
4.2	Caracterização dos materiais de impressão molecular	69
4.3	Caracterização morfológica das partículas em estudo.....	71
4.3.1	Partículas de impressão molecular preparadas.....	71
4.3.2	Outras partículas usadas no estudo.....	78
4.4	Caracterização química dos materiais de impressão molecular.....	80
4.5	Avaliação do efeito de impressão molecular por extração em fase sólida....	82
4.5.1	Partículas de impressão molecular preparadas.....	82
4.5.2	Outras partículas usadas no estudo.....	87
4.6	Aplicação das partículas a técnica lab-on-valve.....	91
Capítulo 5		97
5	Considerações finais	97
Referências bibliográficas		101

Índice de figuras

Figura 1.1. Conceito genérico de impressão molecular: (1) arranjo dos monómeros funcionais à volta da molécula alvo; (2) adição de agentes de entrelaçamento; (3) remoção da molécula alvo; e (4) religação da molécula alvo.	3
Figura 1.2. Imagem ilustrativa do processo de impressão não-covalente: (1) arranjo dos monómeros funcionais á volta da molécula alvo; (2) adição de agentes de entrelaçamento; (3) remoção da molécula alvo; e (4) religação da molécula alvo.	4
Figura 1.3. Imagem ilustrativa do processo de impressão covalente: (1) síntese da molécula alvo polimerizável; (2) polimerização; (3) Extração da molécula alvo por clivagem química; (4) religação da molécula alvo.	5
Figura 1.4. Imagem ilustrativa do processo de impressão semi-covalente: (1) síntese do espaçador polimerizável; (2) polimerização; (3) Extração do espaçador por clivagem química; (4) ligação da molécula alvo; (5) remoção da molécula alvo.	6
Figura 1.5. Esquema do processo de impressão molecular em matriz sol-gel ^[20]	12
Figura 1.6. Representação esquemática das reações que ocorrem no processo sol-gel ^[20]	14
Figura 1.7. Imagem ilustrativa dos diferentes tratamentos que o sol pode ter, para a formação de materiais sol-gel com diferentes configurações ^[27]	15
Figura 1.8. Esquema da estrutura do gel para as reações de catálise ácida e alcalina ^[29]	16
Figura 1.9. Imagem SEM de partículas irregulares MIP (ampliação de 150x) ^[12]	18
Figura 1.10. Imagem SEM de partículas esféricas preparadas por polimerização em suspensão (amplificação de 150x) ^[12]	19
Figura 1.11. Esquema do fenómeno de coalescência.	21
Figura 1.12. Imagem ilustrativa do comportamento da interface W/O com o tipo de cadeia da fase oleosa ^[19]	22
Figura 1.13. Imagem ilustrativa da estrutura de um tensioativo.	23
Figura 1.14. Mapa de fase da variação de água:óleo:tensioativo ^[46]	24
Figura 1.15. Imagem ilustrativa do processo de formação de partículas de sílica de impressão através da combinação do processo sol-gel com a técnica de emulsão W/O.	27
Figura 1.16. Estrutura química do naproxeno.	28
Figura 1.17. Estrutura química do líquido iónico usado como monómero funcional no processo sol-gel.	29
Figura 1.19. Estrutura química do TMOS.	29
Figura 1.20. Esquema da reação do processo sol-gel do estudo.	30
Figura 1.21. Estrutura do SPAN80.	30
Figura 1.22. Estrutura química dos solventes usados na fase oleosa: a) hexano; b) ciclohexano.	31

Figura 1.23. Estrutura química do ibuprofeno.....	31
Figura 2.1. Esquema do passos de extração em SPE.....	35
Figura 2.2. Representação esquemática de uma montagem FIA. Tr: Transportador; Re: reagente; P: Bomba Peristáltica; A: Amostra; R: Reator; D: detetor.	37
Figura 2.3. Cronologia dos sistemas de análise em fluxo ^[64]	38
Figura 2.4. Dispositivo LOV.....	39
Figura 2.5. Representação esquemática de uma bureta multi-seringa (v_i - válvula de comutação; s_i – seringa; posição on linha sólida; posição off linha a tracejado) ^[64]	41
Figura 2.6. Estrutura monolítica do módulo LOV usado.....	41
Figura 3.1. Esquema da reação de síntese do Iodeto de 1-(triethoxysililpropil)-3-(trimethoxysililpropil)-4,5-dihidroimidazólio.	45
Figura 3.2. Esquema da montagem para a síntese do monómero funcional.	45
Figura 3.3. Esquema ilustrativo do procedimento experimental para preparação de partículas de sílica esféricas.	46
Figura 3.4. Esquema ilustrativo do procedimento experimental para preparação de partículas de sílica irregulares.	48
Figura 3.5. Montagem da extração sohlet.....	50
Figura 3.6. Montagem do sistema de extração SPE.....	51
Figura 3.7. Esquema da estrutura da peça do módulo LOV.	52
Figura 4.1. Imagens obtidas por microscopia ótica das partículas preparadas usando como solvente o hexano (ampliações de 100 e 400 vezes). Razões de W/O de 10, 20, 40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B (0,100 g/mL) e C (0,200 g/mL).	64
Figura 4.2. Imagens obtidas por microscopia ótica das partículas preparadas usando como solvente o ciclohexano (ampliações de 100 e 400 vezes). Razões de W/O de 10,20,40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B(0,100 g/mL) e C(0,200 g/mL).	65
Figura 4.3. Histogramas de distribuição de tamanhos das partículas preparadas usando como solvente o hexano). Razões de W/O de 10,20,40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B (0,100 g/mL) e C (0,200 g/mL).	66
Figura 4.4. Histogramas de distribuição de tamanhos das partículas preparadas usando como solvente o ciclohexano.). Razões de W/O de 10,20,40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B (0,100 g/mL) e C (0,200 g/mL).	67
Figura 4.5. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP A (ampliação 100x).	71
Figura 4.6. Imagens de microscópio ótico das partículas MIP A em MEOH após 0s, 60s e 120s de banho de ultrasons (ampliação 100x).	72
Figura 4.7. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP A após o processo de sedimentação (ampliação 100x).	72

Figura 4.8. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP B (ampliação 100x).....	73
Figura 4.9. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP B (ampliação 400x).	73
Figura 4.10. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP C (ampliação 100x).....	74
Figura 4.11. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP D (ampliação 400x).....	74
Figura 4.12. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP D (ampliação 400x).	75
Figura 4.13. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP E (ampliação 100x).....	75
Figura 4.14. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP F (ampliação 100x).	75
Figura 4.15. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP E (ampliação 100x).	76
Figura 4.16. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP F (ampliação 100x).	76
Figura 4.17. Imagens de microscópio ótico MIP/NIP G (ampliação 100 vezes no MIP e ampliação 400 vezes no NIP).....	76
Figura 4.18. Imagem de microscópio ótico das partículas MIP H (ampliação 100 vezes).	77
Figura 4.19. Imagem de microscópio ótico das partículas MIP 525 (ampliação 100 vezes)...	78
Figura 4.20. Imagens de microscópio ótico MIP/NIP 762 (ampliação 100x).	78
Figura 4.21. Imagem de microscópio ótico das partículas MIP NSAIDs (ampliação 100x). ..	79
Figura 4.22. Imagem de microscópio ótico das partículas OASIS™ HLB (ampliação 100x). ..	79
Figura 4.23. Espectro FTIR de reflectância da molécula molde.....	80
Figura 4.24. Espectro FTIR de reflectância do monómero funcional.	80
Figura 4.25. Espectro FTIR de reflectância do monómero funcional, MIP A e MIP H.	81
Figura 4.26. Espectro FTIR de reflectância das partículas de sílica de impressão MIP/NIP D.	81
Figura 4.27. Espectro FTIR de reflectância das partículas de sílica de impressão MIP/NIP D antes e após utilização em SPE.	82
Figura 4.28. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP A, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	83
Figura 4.29. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP A, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	84

Figura 4.30. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP A, carga em H ₂ O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	84
Figura 4.31. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP B, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	85
Figura 4.32. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP C, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	85
Figura 4.33. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP D, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	86
Figura 4.34. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP E, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	86
Figura 4.35. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP F, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	86
Figura 4.36. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP G, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	87
Figura 4.37. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP 525, carga em MeOH e em H ₂ O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	88
Figura 4.38. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP PF, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	88
Figura 4.39. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP PF, carga em H ₂ O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	89
Figura 4.40. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP 762, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	89
Figura 4.41. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP NSAIS's, carga em MeOH e em H ₂ O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	90
Figura 4.42. Representação gráfica dos resultados SPE das partículas OASIS TM HLB, carga em MeOH e carga em H ₂ O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).	90
Figura 4.43. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP A. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).	92
Figura 4.44. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP 525. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).	93
Figura 4.45. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP PF. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).	93
Figura 4.46. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP NSAIDs. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).	94
Figura 4.47. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas OASISTM HLB. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).	94

Índice de tabelas

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens de impressão covalente e não-covalente.	5
Tabela 1.2. Alguns exemplos de agentes de entrelaçamento utilizados em matriz acrílica e em matriz sol-gel ^[19]	9
Tabela 1.3. Diferentes métodos de preparação de um MIP com formato esférico ^[36]	20
Tabela 3.1. Características dos HPLCs utilizados.	44
Tabela 3.2. Razões Molares dos diferentes componentes da solução sol-gel para a preparação de partículas de sílica de esférica.....	47
Tabela 3.3. Razões Molares dos diferentes componentes da solução sol-gel para a preparação de partículas de sílica irregulares.	49
Tabela 3.4. Partículas usadas na técnica de fluxo lab-on-valve.....	53
Tabela 3.5. Protocolo experimental do carregamento das partículas da fase sólida.	54
Tabela 3.6. Protocolo experimental do condicionamento da coluna de extração.	54
Tabela 3.7. Protocolo experimental do carregamento da amostra.	55
Tabela 3.8. Protocolo experimental da eluição com H ₂ O.	56
Tabela 3.9. Protocolo experimental da eluição com MeOH.	57
Tabela 3.10. Protocolo experimental da eluição com uma solução de 1% CH ₃ COOH em MeOH.....	58
Tabela 3.11. Protocolo experimental de descarte das partículas e limpeza do canal da coluna.	59
Tabela 4.1. Tamanhos médios das partículas de sílica preparadas.	68
Tabela 4.2. Parâmetros de síntese e lavagem das partículas de sílica preparadas.....	70
Tabela 4.3. Resumo das características das partículas de sílica de impressão preparadas.....	77
Tabela 4.4. Resumo das características de outras partículas usadas durante o estudo.	79
Tabela 4.5. Massa das colunas extratoras usadas em LOV	92

Lista de abreviaturas

FI	Injeção em fluxo (Flow Injection)
FTIR	Infravermelho por transformada de Fourier (Fourier transform infrared)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (High-performance liquid chromatography)
IBU	Ibuprofeno
LOV	Lab-On-Valve
MIP	Polímero de Impressão Molecular
NAP	Naproxeno
NIP	Polímero de Controlo (Non-Imprinted Polimer)
O/W	Óleo em água (Oil in Water)
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento (Scanning Electron Microscope)
SIA	Injeção em fluxo sequencial (Sequential Injection Analysis)
SPAN80	Sorbitano (Z)-mono-9-octadecenoato
SPE	Extração em Fase Sólida (Solid Phase Extraction)
TMOS	Tetrametoxisilano
W/O	Água em óleo (Water in Oil)

Capítulo 1

1 Introdução

1.1 Reconhecimento molecular

O reconhecimento molecular é um fenómeno descrito como a ligação preferencial de uma molécula a um recetor com grande seletividade relativamente a outras moléculas^[1].

Os sistemas de reconhecimento molecular são um conceito subjacente ao mundo biológico, uma vez que os processos vivos se baseiam em interações específicas a nível molecular (replicação, transcrição e tradução de DNA, anticorpo-antigénio, enzima-substrato entre outros)^[2].

Os sistemas de reconhecimento molecular têm um elevado número de aplicações em diversas áreas entre elas a química analítica^[1]. Os polímeros de impressão molecular (MIP) têm sido aplicados em várias técnicas, tais como, cromatografia líquida, eletrocromatografia capilar e eletroforese capilar, extração em fase sólida, microextração em fase sólida, e como adsorventes seletivos em sensores químicos^[3]. Na verdade a impressão molecular tem aplicação em praticamente todas as áreas de análise química, onde um substrato seletivo é uma das principais exigências^[4].

1.2 Impressão molecular

Foi no início dos anos 30, que Polyakov^[5] reportou pela primeira vez as propriedades invulgares de adsorção em partículas de sílica, preparadas utilizando um novo procedimento. Aparentemente, a estrutura porosa da sílica teria sido influenciada pela presença dos solventes utilizados no estudo (benzeno, tolueno e xileno), apresentando a sílica uma espécie de memória para o solvente utilizado em cada um dos casos e adsorvendo-o melhor, surgindo a impressão molecular.

Também os trabalhos de Breinl e Haurowitz^[6], em 1930, e Mudd^[7], em 1932, contribuíram para a origem deste conceito, uma vez que apresentavam teorias para a formação de anticorpos pelo sistema imunitário.

Dickey^[8] na tentativa de produzir sílica gel com afinidade para moléculas corantes, observou que um gel de sílica que fora exposto, durante a polimerização, à molécula de corante (gel impresso) adsorvia mais corante do que um gel que não fora exposto à molécula de corante durante a polimerização (gel não impresso).

Morrison et al^[9] em 1959, propôs o mecanismo de impressão molecular, sugerindo que as moléculas utilizadas como molde são encurraladas na matriz e determinam a seletividade inerente ao processo.

A preparação de materiais de impressão molecular (MIPs) consiste na polimerização de monómeros funcionais na presença da molécula molde ou de uma molécula análoga^[10]. O processo inicia-se com a dissolução da molécula alvo, dos monómeros funcionais, dos

agentes de entrelaçamento e do catalisador num solvente (também conhecido como agente porogénico). Os monómeros funcionais são escolhidos de modo a que possam interagir com a molécula molde e irão organizar-se em torno dela. As posições dos monómeros são fixadas numa posição que é “congelada” por co-polimerização do agente de entrelaçamento. Após a polimerização, a molécula molde é removida do polímero por extração^[11], deixando cavidades capazes de se religar à molécula molde (Figura 1.1).

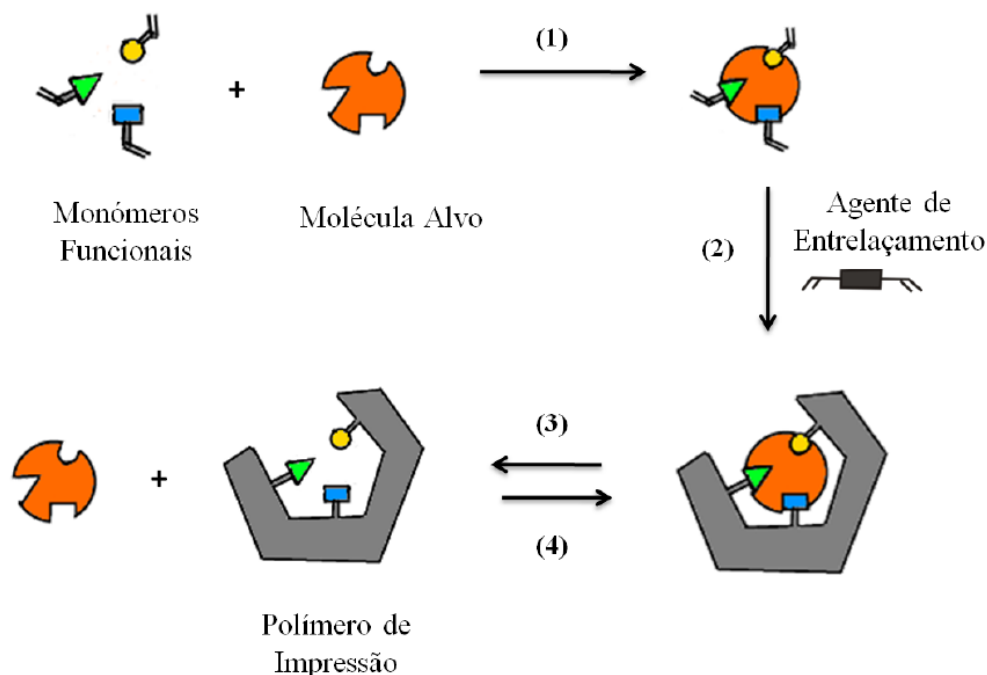


Figura 1.1. Conceito genérico de impressão molecular: (1) arranjo dos monómeros funcionais à volta da molécula alvo; (2) adição de agentes de entrelaçamento; (3) remoção da molécula alvo; e (4) religação da molécula alvo.

Os materiais de impressão molecular podem ser obtidos por três métodos diferentes, covalente, não covalente e semi-covalente, dependendo da natureza de ligação entre monómeros funcionais e a molécula molde^[4].

1.2.1 Impressão não covalente

Os materiais de impressão molecular (Figura 1.2) não covalentes usam o mesmo tipo de interações que os sistemas de reconhecimento molecular biológicos (por exemplo, ligações de H, interações electrostáticas e interações π). A interação entre o monómero funcional e a molécula molde é não covalente durante a síntese e durante a religação. Os monómeros funcionais utilizados podem ter características ácidas, básicas ou neutras^[4].

A abordagem de impressão não covalente tem sido usada para grande variedade de moléculas molde, incluindo aminoácidos, herbicidas, pesticidas, fungicidas, narcóticos,

antibióticos. Tendo sido também, aplicado a grandes moléculas como é o caso das proteínas^[12].

Neste tipo de impressão, os monómeros estão frequentemente presentes em excesso, havendo assim maior possibilidade de formação de locais de ligação não específicos, diminuindo a seletividade da ligação^[12, 13]

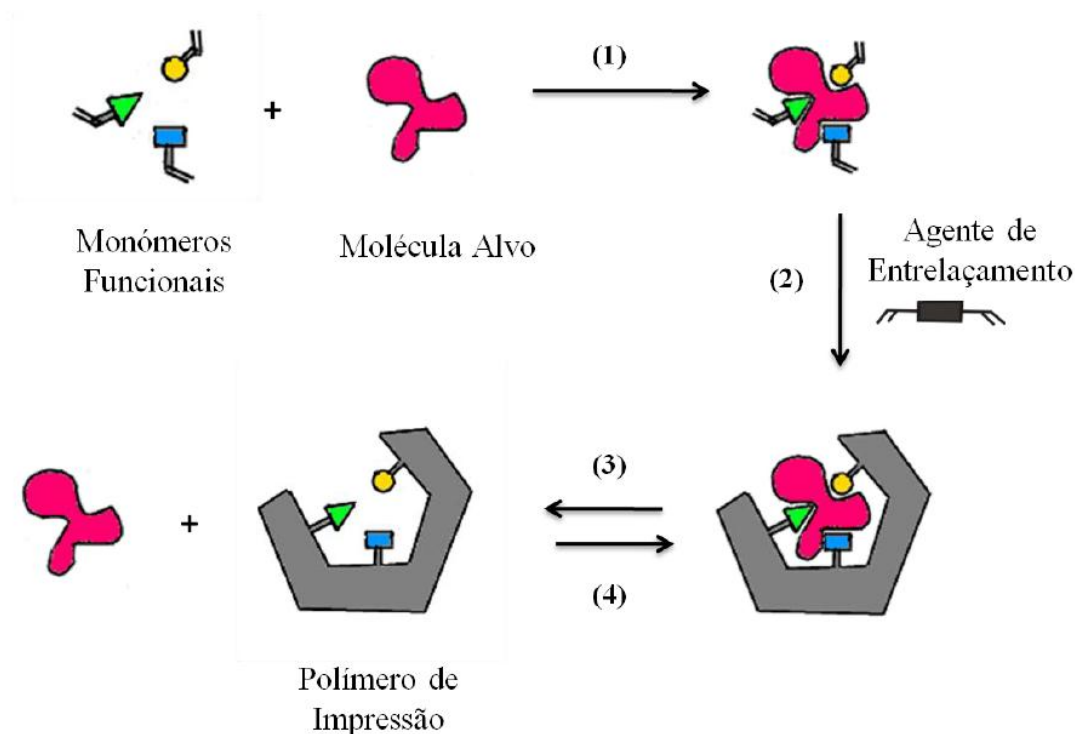


Figura 1.2. Imagem ilustrativa do processo de impressão não-covalente: (1) arranjo dos monómeros funcionais à volta da molécula alvo; (2) adição de agentes de entrelaçamento; (3) remoção da molécula alvo; e (4) religação da molécula alvo.

1.2.2 Impressão covalente

A impressão molecular covalente (Figura 1.3) distingue-se pelo uso de moléculas molde que se ligam covalentemente a um ou mais dos grupos polimerizáveis^[14]. A ligação entre a molécula molde e o monómero funcional é formada antes da polimerização (pré-polimerização). A polimerização é realizada de maneira usual, mas a remoção e religação da molécula molde dá-se por processos químicos e não físicos. Como apenas estão presentes ligações covalentes, a heterogeneidade é baixa, embora este tipo de impressão apresente um maior grau de especificidade, é limitada pela capacidade da molécula molde conseguir estabelecer ligações covalentes com o monómero funcional e pela facilidade com que esta ligação se vai quebrar^[4].

A vantagem desta abordagem é que o grupo funcional pode apenas ser associado à molécula molde, no entanto, apenas um número limitado de compostos pode ser impresso

usando este método, são eles álcoois (diois), aldeídos, cetonas, aminas e ácidos carboxílicos^[14].

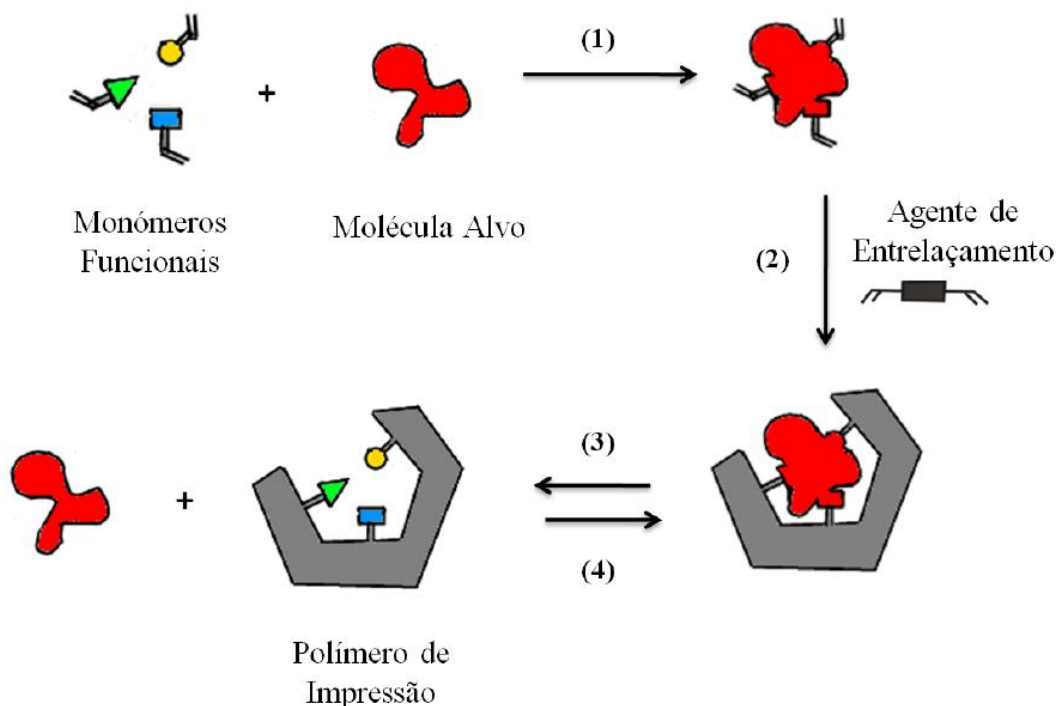


Figura 1.3. Imagem ilustrativa do processo de impressão covalente: (1) síntese da molécula alvo polimerizável; (2) polimerização; (3) Extração da molécula alvo por clivagem química; (4) religação da molécula alvo.

No geral, a impressão não covalente é mais fácil de conseguir e pode ser aplicada a uma gama mais vasta de moléculas molde. No entanto, no que diz respeito ao rigor de impressão, a impressão covalente normalmente é superior. Ambos têm vantagens e desvantagens (ver Tabela 1.1), portanto, deve-se escolher entre estes dois métodos, dependendo da necessidade, tipo de molécula alvo, monómeros funcionais, o custo e o tempo permitido para a preparação, entre outros^[13].

Tabela 1.1. Vantagens e desvantagens de impressão covalente e não-covalente.

	Covalente	Não-covalente
Síntese do complexo monómero funcional-molécula alvo	Necessário	Não necessário
Condições de polimerização	Livre	Restrito
Remoção da molécula alvo após polimerização	Difícil	Fácil
Ligação e quebra de ligação da molécula alvo	Lento	Rápido

A impressão semi-covalente surge como uma solução para combater os problemas de ambas as técnicas^[13].

1.2.3 Impressão semi-covalente

A impressão semi-covalente (Figura 1.4) combina a impressão covalente com a impressão não-covalente, os polímeros são preparados como na impressão covalente a religação, no entanto, depende de ligações não-covalentes^[13]. Quando a molécula molde é clivado do polímero, é deixado para trás, no local de clivagem um grupo funcional capaz de se ligar não-covalentemente à molécula alvo^[12].

A cavidade deixada para trás após a clivagem da molécula alvo é muitas vezes demasiado pequena para acomodar a molécula alvo, durante a religação não covalente. Este problema foi abordado por Whitcombe em 1994, quando a abordagem com um espaçador foi introduzida^[15]. Nesta abordagem, os monómeros estão covalentemente ligados à molécula alvo através de espaçadores. Os espaçadores são eliminados uma vez que o processo de impressão é concluído, dando espaço adequado e funcional para grupos de interações não-covalentes com a molécula alvo^[12].

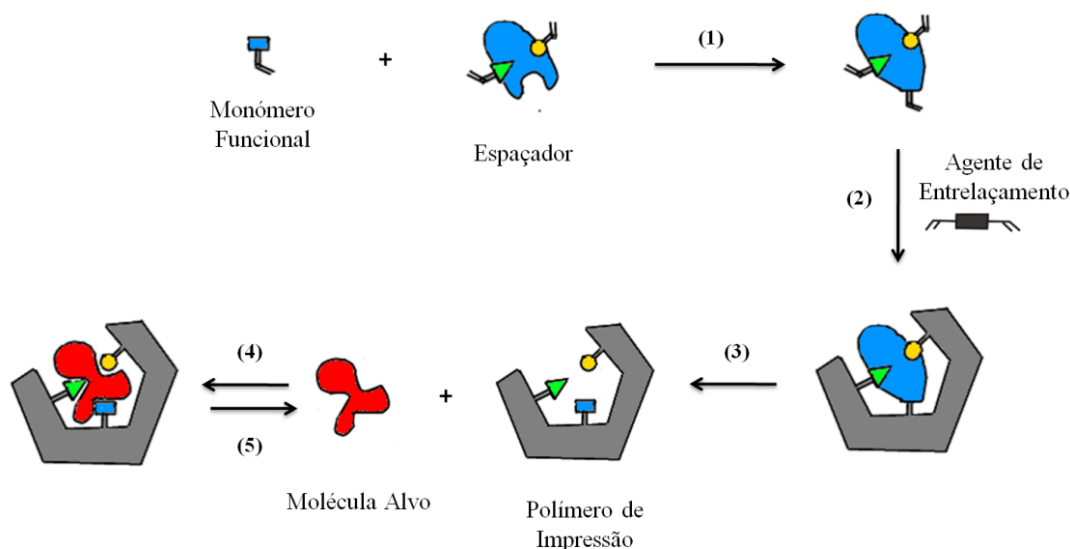


Figura 1.4. Imagem ilustrativa do processo de impressão semi-covalente: (1) síntese do espaçador polimerizável; (2) polimerização; (3) Extração do espaçador por clivagem química; (4) ligação da molécula alvo; (5) remoção da molécula alvo.

1.3 Preparação de materiais de impressão molecular

A síntese de MIPs é um procedimento relativamente simples e barato. O polímero de impressão molecular é preparado pela dissolução da molécula alvo, dos monómeros funcionais, dos agentes de entrelaçamento e do catalisador num solvente (também conhecido como agente porogénico)^[16].

Apesar de o procedimento de impressão molecular ser relativamente simples, é necessário otimizar uma série de parâmetros experimentais inerentes ao processo. De seguida descrever-se-ão as características e funções de cada um destes parâmetros.

1.3.1 Molécula molde

A molécula molde é de central importância nos sistemas de impressão molecular, pois é à sua volta que se dará a organização dos grupos funcionais dos monómeros funcionais. É esta organização, que vai levar à formação das cavidades seletivas do polímero. Idealmente, em termos de compatibilidade, a molécula molde deve ser quimicamente inerte nas condições de polimerização, não possuir grupos polimerizáveis, não apresentar qualquer funcionalidade que iniba ou retarde a polimerização e ser estável a temperaturas relativamente elevadas^[17].

O método de impressão molecular pode ser aplicado a uma diversificada gama de analitos, no entanto, nem todas as moléculas molde são passíveis de impressão molecular. A impressão de pequenas moléculas orgânicas em matriz acrílica (por exemplo, fármacos, pesticidas, aminoácidos e péptidos, nucleótidos, esteróides, e açúcares) está bem estabelecida e é considerada quase rotina. No entanto, a impressão molecular de maiores dimensões (como proteínas) e células pode apresentar desafios. A principal razão, é o facto, deste tipo de moléculas/ estruturas serem menos rígidas dificultando a criação de cavidades bem definidas durante o processo de impressão^[16].

Em alguns casos, a molécula molde a ser utilizada é demasiado tóxica e perigosa para ser utilizada em laboratórios. Sendo, em alguns casos, possível utilizar um substituto apropriado (molécula análoga) que tem uma estrutura similar à da molécula molde e cuja utilização acarreta menos perigo^[16].

1.3.2 Monómero funcional

A seletividade MIP surge, em grande parte, da interação entre a molécula molde e os monómeros funcionais. Como tal, a escolha dos monómeros funcionais é de grande importância para a obtenção de materiais de impressão molecular^[18].

Geralmente, a escolha do monómero funcional é feita em função dos seus grupos funcionais e, de forma a que estes sejam complementares aos grupos funcionais da molécula molde. Na escolha do monómero funcional, deve-se ainda ter em conta a aplicação do MIP, e o ambiente químico em este que vai ser usado^[18]. Uma ampla variedade de monómeros funcionais, incluindo ácidos, básicos, neutros e hidrofóbicos, tem sido testada na síntese de MIPS^[12].

Quando dois ou mais monómeros funcionais são utilizados simultaneamente na mistura de polimerização é importante ter em conta as proporções de cada um dos monómeros e a sua reatividade para assegurar que a copolimerização é viável. Além disso, a complexação de uma molécula molde com o monómero funcional pode afetar a reatividade dos monómeros como resultado de perturbações eletrónicas ou estéricas dos mesmos^[17].

Na impressão covalente a razão entre a molécula molde e o monómero funcional não é de grande importância, pois é o número de moléculas molde que dita o número de moléculas de monómero funcional que a elas se ligam covalentemente. O monómero funcional está ligado à molécula molde covalentemente de forma estequiométrica^[16].

Para a impressão não-covalente, a razão ideal de molécula alvo e monómero funcional é obtida empiricamente, através da avaliação de diversos polímeros feitos com formulações diferentes com o aumento da razão de molécula alvo. A razão subjacente a este facto provém do princípio de Le Chatelier. Aplicando o princípio de Le Chatelier para o complexo formado antes da polimerização, quando se faz aumentar a concentração de componentes ou a afinidade de ligação do complexo na mistura antes da polimerização, poderá prever-se um aumento do complexo de pré-polímero. Do mesmo modo, há um aumento do número de locais de ligação no polímero final, resultando num aumento de ligações ou seletividade por grama de polímero. Para que a impressão seja altamente eficiente o complexo molécula alvo-monómero funcional deve existir em excesso relativamente à molécula alvo e ao monómero funcional livres já que, de outro modo, ocorreria polimerização não seletiva diminuindo a eficiência da impressão molecular^[16].

1.3.3 Agente de entrelaçamento

Várias moléculas contendo dois ou mais grupos polarizáveis, têm sido utilizadas como agentes de entrelaçamento (ou precursor) na impressão molecular (Tabela 1.2). O agente de entrelaçamento desempenha funções importantes na impressão molecular, confere ao polímero estabilidade nos locais de ligação, transmite estabilidade mecânica, é importante no controlo da morfologia do polímero e torna o polímero insolúvel em determinados solventes, aumentando assim, a sua gama de aplicação. O precursor é escolhido de forma a que este não interaja com a molécula molde, mas existem algumas exceções^[12, 17].

Tendo em conta a eficiência da polimerização utilizam-se, geralmente, elevadas razões de agentes de entrelaçamento (na ordem dos 80%) de modo a obter materiais porosos e com estabilidade mecânica^[17].

Para que a impressão seja eficiente, a reatividade do agente de entrelaçamento deve ser semelhante à do(s) monómero(s) funcional(ais) utilizado(s), caso contrário pode ocorrer a polimerização predominante de um deles impedindo que a co-polimerização ocorra em extensão suficiente. Ao escolher um precursor adequado, a co-polimerização ocorrerá de forma aleatória, e os resíduos funcionais (derivados dos monómeros funcionais) serão uniformemente distribuídos na rede polimérica^[13].

A proporção molar entre o agente de entrelaçamento e o monómero funcional também é de grande importância. Se esta proporção for muito pequena, os locais de impressão molecular estão tão próximos que não conseguem funcionar independentemente (uma cavidade pode inibir o funcionamento das que lhe estão mais próximas). Se, por outro lado, a proporção for muito grande, a eficiência da impressão molecular diminui, principalmente quando os agentes de entrelaçamento estabelecem ligações não-covalentes com os monómeros funcionais e, ou a molécula molde^[13].

Alguns exemplos de monómeros funcionais utilizados em matriz acrílica e em matriz sol-gel estão descritos na Tabela 1.2.

Tabela 1.2. Alguns exemplos de agentes de entrelaçamento utilizados em matriz acrílica e em matriz sol-gel^[19]

Matriz Sol-gel	Matriz Acrílica
Tetraetiloxisilano	p-divinilbenzeno
Tetrametiloxisilano	Trimetilpropano trimetacrilato
Tetrabutoxisilano	pentaertritol tetraacrilato
Dimetildietoxisilano	1,3-diisopropenil benzeno
Feniltrimetoxisilano	N,N'-metilenediacrilamida
Feniltrietoxisilano	Tetrametileno dimetiacrilato

1.3.4 Solvente

O solvente ou agente porogénico tem como função a dissolução dos componentes da polimerização. Tem também um papel fundamental na formação das estruturas porosas dos MIPs, e no aumento da eficiência dos locais de impressão, facilitando ainda a remoção das moléculas molde. A remoção da molécula alvo do polímero também é facilitada pela porosidade^[13].

Na polimerização, as moléculas de solvente são incorporadas dentro dos polímeros e são removidas no pós-tratamento. Durante estes processos, o espaço originalmente ocupado pelas moléculas de solvente é deixada como poros nos polímeros. Os polímeros preparados na ausência de solventes são consistentemente muito firmes e densos, e dificilmente as moléculas alvo se religam. Assim, a natureza e a quantidade de solvente adicionado pode ser usado para controlar a morfologia e o volume total de poros no material de impressão^[13, 17].

A escolha do solvente depende do tipo de impressão. Na impressão covalente, podem ser usados diversos solventes desde que estes dissolvam todos os componentes da mistura de polimerização. No entanto, na impressão não-covalente, a escolha do solvente influencia a formação dos adutos não-covalentes entre o monómero funcional e a molécula molde uma vez que a extensão do pré-polímero não-covalente depende da polaridade do solvente. De facto, solventes menos polares aumentam a formação do complexo facilitando interações não-covalentes polares, tais como, pontes de hidrogénio. Enquanto, solventes mais polares tendem a quebrar as interações não-covalentes no complexo do pré-polímero, principalmente os solventes próticos que proporcionam um elevado grau de disrupção das ligações de hidrogénio^[13, 17].

Outro papel do solvente é dispersar o calor gerado na reação de polimerização, caso contrário, a temperatura da reação é elevada a nível local, efeitos secundários como reações indesejáveis podem ocorrer. Além disso, a formação do complexo monómero funcional – molécula alvo, que é exigida para a impressão não-covalente eficiente, poderia ser suprimida^[13].

1.4 Impressão molecular em diferentes matrizes

A grande maioria dos polímeros de impressão molecular é baseada na polimerização radicalar do tipo acrílico. Uma limitação deste tipo de polimerização é o facto de requerer um solvente orgânico em que todas as espécies da mistura reacional sejam solúveis. Moléculas molde que sejam apenas solúveis em solventes aquosos não são passíveis de impressão molecular por este método. Isto apresenta evidentes limitações para a sua utilização em aplicações ambientais e biológicas^[4].

Outra forma de obtenção de polímeros de impressão molecular é a polimerização em matriz sol-gel. Os polímeros obtidos por polimerização sol-gel são polímeros de base inorgânica (silanos) formados pela hidrólise ácida ou básica e por reações de condensação de monómeros de silício. Os materiais sol-gel são materiais bastantes versáteis e com uma elevada gama de aplicações^[4].

Nos pontos que se seguem será discutido com maior pormenor a utilização de matrizes acrílicas e matrizes sol-gel na produção de materiais de impressão molecular.

1.4.1 Impressão molecular em matriz acrílica

Em matriz acrílica, o método de síntese mais usado é a polimerização de radical livre (ou o crescimento de cadeia). Numerosos monómeros vinílicos podem ser polimerizados de forma eficaz, com excelentes rendimentos, por este método, incluindo estireno, etileno e metacrilato de metilo que são de particular importância na indústria^[17].

A polimerização de radical livre pode ser realizada sob condições reacionais suaves, por exemplo, temperatura ambiente e pressão atmosférica. Por estas razões, bem como o facto dos monómeros de vinilo serem de baixo custo, a polimerização de radicais livres é geralmente o método de escolha para a preparação de polímeros molecularmente impressos. O mecanismo da polimerização de radicais livres é caracterizado por três fases distintas: (1) iniciação, (2) propagação, e (3) de terminação^[17].

Neste tipo de impressão é desejável que ocorra a polimerização simultânea (co-polimerização) entre dois ou mais monómeros vinílicos, isto permite que os polímeros preparados tenham propriedades químicas diferentes de que cada um dos monómeros utilizados. Porém, é necessário ter em atenção as reatividades relativas dos monómeros constituintes para que todos os monómeros sejam consumidos à mesma velocidade, caso contrário torna-se difícil prever a distribuição das unidades dos monómeros no co-polímero. Apesar de já existirem tabeladas as razões de reatividade para os pares de monómeros mais comuns, a escolha dos monómeros deve ser criteriosa^[17].

1.4.2 Impressão molecular em matriz sol-gel

A técnica de sol-gel é uma técnica promissora na ciência dos materiais. A sua versatilidade permite a incorporação eficiente de compostos orgânicos em estruturas poliméricas inorgânicas utilizando condições térmicas suaves^[20].

Este é um método conveniente para conceber materiais de impressão estáveis e robustos. O elevado grau de reticulação nestes materiais é uma propriedade muito útil para a síntese de materiais de impressão molecular. Em materiais totalmente inorgânicos apresenta elevada estabilidade térmica, permitindo a remoção da molécula molde por métodos que usam temperaturas elevadas, sem perda das características de reconhecimento^[21].

A Figura 1.5 exemplifica o modelo de comportamento típico de polimerização de um material de impressão molecular.

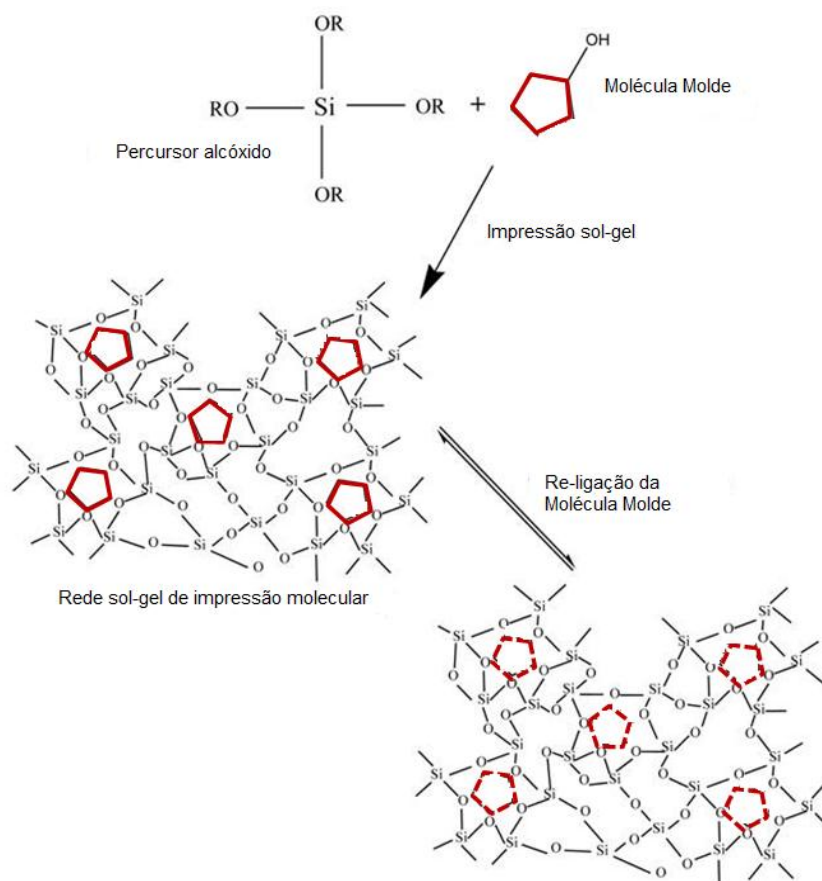


Figura 1.5. Esquema do processo de impressão molecular em matriz sol-gel^[20].

Materiais de sol-gel são extremamente versáteis e têm uma ampla área de aplicação em química analítica^[22] podendo o produto final ser configurado de diferentes formas, como pó, filmes, fibras, monólitos, etc^[20].

1.5 Processo sol-gel

O processo sol-gel compreende a evolução de redes inorgânicas através da formação de uma suspensão coloidal de partículas num líquido (sol) e a gelificação do sol para formar uma rede numa fase líquida contínua (gel). Desta forma, os materiais inorgânicos homogéneos com propriedades desejáveis de dureza, resistência química e térmica, polaridade e porosidade podem ser produzidos a temperatura ambiente^[23].

Os reagentes envolvidos na preparação de polímeros de tecnologia sol-gel incluem um precursor, um solvente para dispersar o precursor e um catalisador.

O processo inicia-se pela hidrólise do precursor (Figura 1.6). Os precursores usados para sintetizar estes coloides consistem em elementos metálicos rodeados por vários ligandos reativos. Os alcóxidos metálicos são os precursores mais utilizados, uma vez que reagem rapidamente com a água^[23]. No entanto, a reatividade dos alcóxidos metálicos depende da força do nucleófilo, do carácter electrofílico do átomo metálico e da sua capacidade de aumentar o seu número de coordenação^[24].

Neste estudo, o silício foi o átomo metálico envolvido. Devido ao seu baixo carácter electrofílico e baixo número de coordenação, igual a 4, os alcóxidos de silício não são muito reativos, podendo isso ser resolvido pela adição de catalisadores adequados^[24].

Durante a hidrólise dos alcóxidos de silícios dá-se a substituição dos grupos (OR) por grupos (OH), resultando num grupo silanol (Si-OH), onde os ligandos hidroxilo estão ligados ao átomo de silício. Os produtos da reação de hidrólise sofrem reações de condensação das quais resultam cadeias silicatadas mais ou menos ramificadas e moléculas de água ou de álcool^[25].

Na maioria das condições a condensação inicia-se antes do fim da hidrólise. Em condições básicas as reações ocorrem a velocidades semelhantes produzindo um polímero altamente condensado. Em condições ácidas a reação de hidrólise é mais rápida produzindo um polímero linear ramificado^[10].

À medida que as reações de hidrólise e condensação se dão, as moléculas individuais vão-se agregando numa suspensão coloidal, dando lugar a uma rede polimérica que abrange toda a mistura reacional (gelificação)^[23].

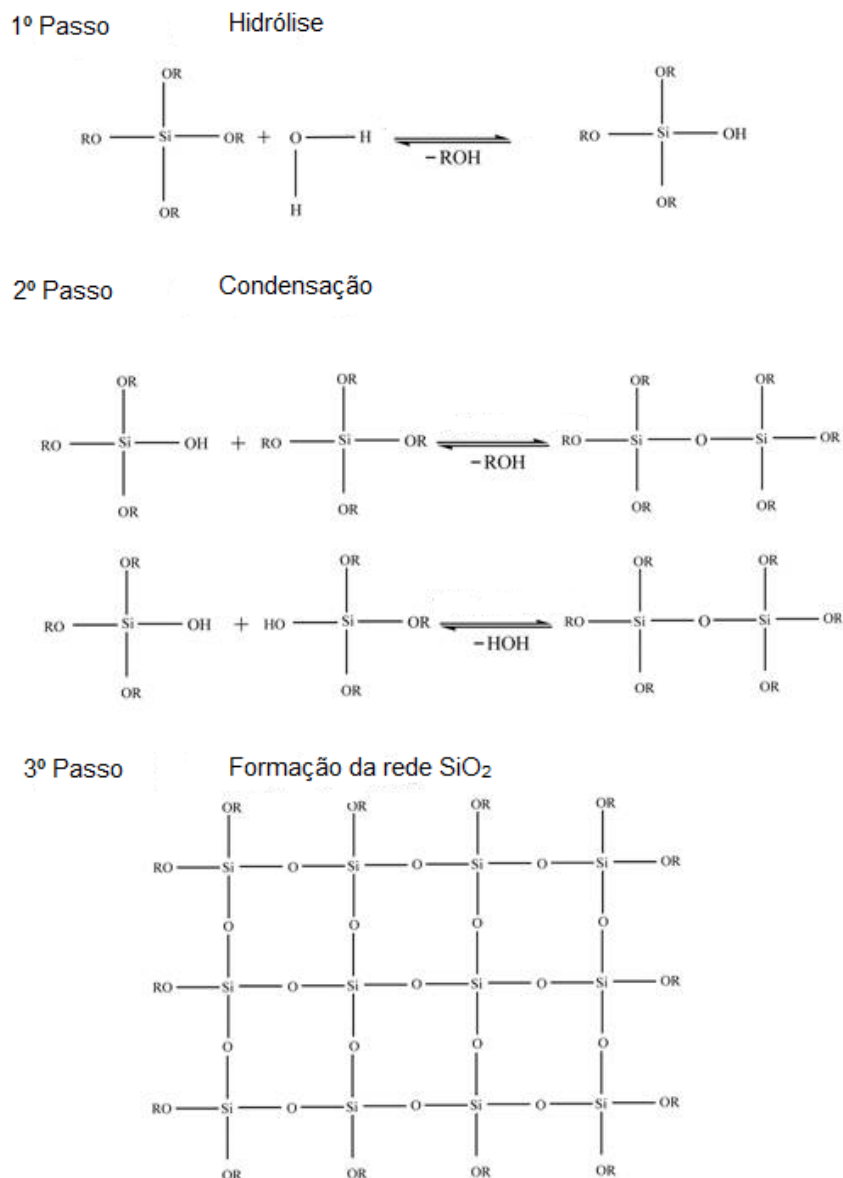


Figura 1.6. Representação esquemática das reações que ocorrem no processo sol-gel^[20].

São várias as vantagens desta tecnologia, entre elas estão: uma maior estabilidade térmica, uma elevada porosidade que leva a uma maior área de superfície. Os revestimentos de tecnologia sol-gel têm um elevado grau de flexibilidade^[26].

A tecnologia sol-gel permite produzir diversos materiais, de vários tamanhos e formatos (Figura 1.7).

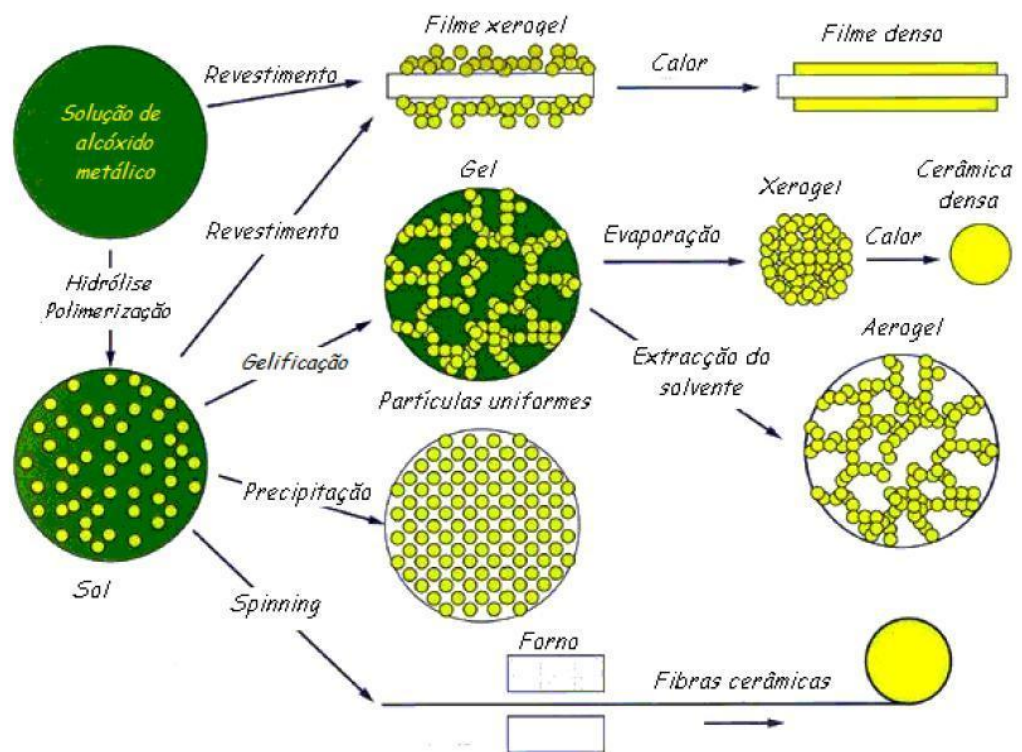


Figura 1.7. Imagem ilustrativa dos diferentes tratamentos que o sol pode ter, para a formação de materiais sol-gel com diferentes configurações^[27].

Variando a proporção dos reagentes da solução sol-gel consegue-se alterar a composição do polímero^[26].

1.5.1 Fatores que influenciam o processo pol-gel

As reações sol-gel vão depender de parâmetros tais como: o pH da solução, a temperatura da reação, a natureza do solvente e envelhecimento e secagem do sol-gel. Diferenças nestas variáveis implicam diferenças nas características fundamentais do sol-gel, tais como, a homogeneidade, a porosidade, o índice de refração da superfície e nas propriedades mecânicas e térmicas do polímero^[10].

1.5.1.1 pH

A hidrólise do processo sol-gel é mais rápida e completa quando se usam catalisadores (ácido/base). Embora ácidos inorgânicos ou amoníaco sejam os mais usados no processamento sol-gel, são conhecidos outros catalisadores como ácido acético, hidróxido de potássio, aminas, fluoreto de potássio, ácido fluorídrico, alcóxidos de titânio, alcóxido de vanádio e outros óxidos metálicos.^[10, 28]

As hidrólises que ocorrem em meio ácido (Figura 1.8) conduzem à formação de redes de polímeros lineares ou ligeiramente ramificados enquanto a hidrólise que se dá em meio básico, origina redes de polímero muito ramificadas. A velocidade de condensação depende do pH do sol e é maior a um pH intermédio. Assim, o pH desempenha um papel muito importante na determinação da estrutura do sol-gel. É também importante, ter presente que as alterações no valor de pH afetam o processo de impressão, assim como, a estrutura original de moléculas alvo que são sensíveis aos valores de pH, e ainda a religação da molécula alvo após a extração. O valor de pH da solução do analito durante a síntese do sol-gel pode afetar a religação da molécula alvo^[10].

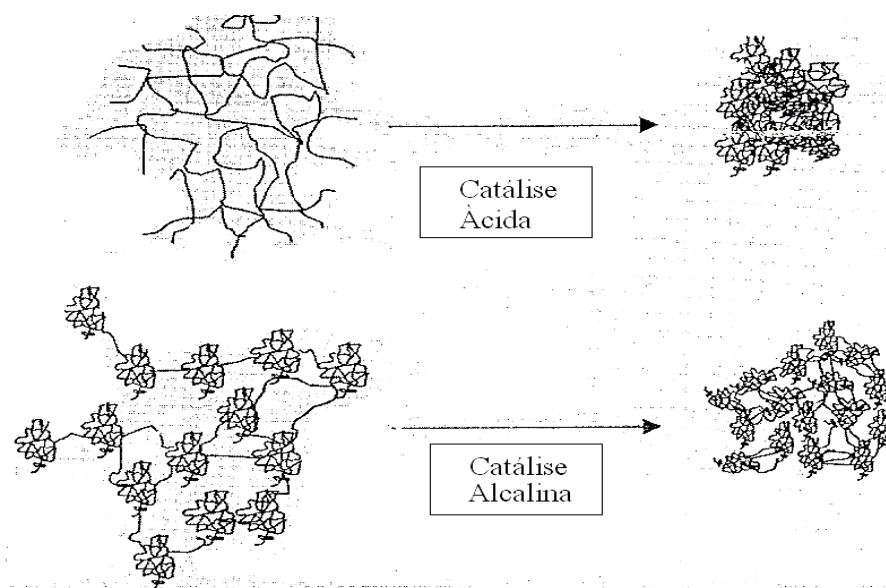


Figura 1.8. Esquema da estrutura do gel para as reações de catálise ácida e alcalina^[29].

1.5.1.2 Solvente

Geralmente em processos sol-gel, os solventes são adicionados com o fim de facilitar a mistura dos precursores inorgânicos com a água e para a produção de uma mistura sol mais homogénea. Para além da homogeneização, o solvente influencia a taxa de hidrólise e de condensação aumentando ou diminuindo a catalítica, devido a pontes de hidrogénio com a molécula de solvente, ou por, simples diluição da solução sol bem como a redução da concentração de precursor^[30, 31].

1.5.1.3 Temperatura

A temperatura afeta a cinética de gelificação do processo sol-gel, influenciando as propriedades físico químicas, tais como, a porosidade, a espessura do sol-gel, os materiais derivados (monólitos/filmes), bem como, a remoção da molécula alvo quando a calcinação é utilizada como método de extração^[32].

1.5.1.4 Processo de envelhecimento (ou “aging”) e secagem do sol-gel

As condições de envelhecimento e de secagem do sol-gel têm repercussões nas propriedades estruturais do polímero.

O envelhecimento refere-se ao processo de mudança na estrutura e nas propriedades que ocorre durante a formação de ligações durante o processo do sol-gel. O envelhecimento tem lugar após o passo inicial de mistura. A mistura sol-gel ainda líquida é deixada em repouso por um período de tempo para permitir a hidrólise e condensação. Pode-se recorrer à aplicação de temperatura para acelerar o processo. Prolongar o período de hidrólise e condensação aumenta o grau de ligação cruzada e aumenta a viscosidade do sol^[30, 33].

A secagem do sol-gel refere-se ao processo de remoção de líquidos e solventes dentro da estrutura da rede polimérica. Durante este processo, o polímero sol-gel pode perder porosidade tornando-se muito denso^[30].

1.6 Formatos que os materiais de impressão molecular podem adquirir

Os materiais de impressão molecular podem ser preparados em diferentes formatos usando para isso diferentes técnicas de polimerização. Seguidamente será discutida a preparação de MIPs em partículas irregulares, em forma esférica e em membranas e filmes.

1.6.1 Partículas irregulares

Esta é considerada a maneira tradicional de sintetizar MIPs e é referida como polimerização em monólito. Após ocorrer a polimerização, o monólito de polímero é grosseiramente esmagado, em seguida é moído e peneirado, quer manualmente quer mecanicamente, para se obter partículas da gama de tamanhos apropriados. Posteriormente a molécula alvo é extraída do polímero, e finalmente, as partículas são secas^[12, 34].

Este processo é demorado e de trabalho intensivo, produz ainda grandes quantidades de partículas de tamanhos indesejados, existindo um limitado controlo sobre o tamanho e forma das partículas. Assim, a forma das partículas é bastante imprevisível e altamente irregular, tornando estes materiais pouco indicados para fins cromatográficos. O processo de moagem pode ser prejudicial para alguns locais de ligação^[35].

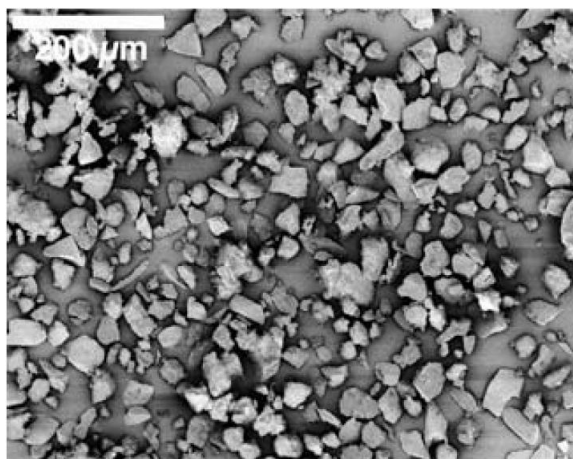


Figura 1.9. Imagem SEM de partículas irregulares MIP (ampliação de 150x)^[12].

1.6.2 Membranas e filmes

Os filmes de MIP são polimerizados dentro de moldes ou em superfícies planas. As superfícies com grupos polarizáveis são as mais indicadas, pois permitem a ligação covalente à superfície. Estes filmes são usados como elementos sensoriais em sensores MIP^[12, 14].

As membranas de impressão molecular podem ser preparadas como filmes grossos ou como compósitos nos poros da base de membrana. Nas membranas de compósito, a seletividade do material de impressão molecular é combinado com as propriedades da base de membrana^[12].

A natureza seletiva dos MIPs permite a possibilidade de preparação de membranas com permeabilidade seletiva^[12].

1.6.3 Partículas de forma esférica

As partículas de forma esférica possuem melhores características hidrodinâmicas e de difusão que as partículas de forma irregular. São assim mais indicadas para a aplicação em técnicas de fluxo, uma vez que, conseguem ser empacotadas de forma mais eficiente e geram menores pressões na coluna. Estas partículas são mais robustas e menos propensas à fragmentação^[12].

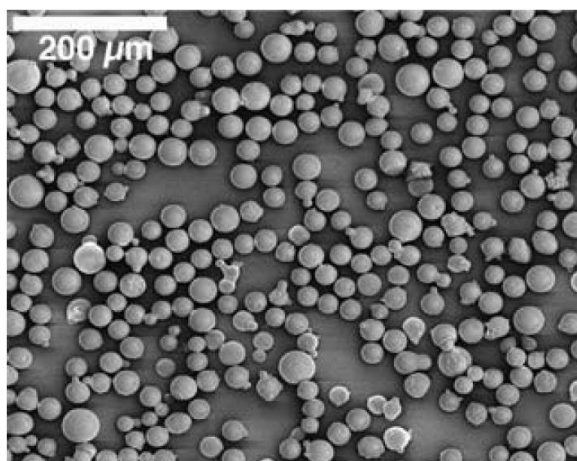


Figura 1.10. Imagem SEM de partículas esféricas preparadas por polimerização em suspensão (amplificação de 150x)^[12].

A Tabela 1.3 apresenta alguns métodos de preparação de MIPs que levam à formação de partículas esféricas com intervalos de vários tamanhos.

Tabela 1.3. Diferentes métodos de preparação de um MIP com formato esférico^[36].

Métodos	Descrição	Vantagens	Desvantagens
Polimerização em suspensão	Polimerização em suspensão numa fase aquosa ou oleosa contínua	Os tensioativos podem promover a formação de partículas esféricas, que podem ser utilizadas em colunas cromatográficas	Não aplicável em casos de impressão com monómeros funcionais hidrofílicos em suspensão aquosa ou monómeros funcionais hidrofóbicos em suspensão oleosa
Polimerização em suspensão de perfluorocarbono	Polimerização em suspensão numa fase contínua de perfluorocarbono	Aplicável à maioria dos sistemas de impressão (tamanho de partícula ajustável)	Há necessidade de tensioativos específicos
Polimerização por semeadura	Polimerização por inchamento faseado das partículas	Compatível com a impressão. As partículas podem ser obtidas para colunas cromatográficas	Passos de inchamento faseado complicados; geralmente não compatível para sistemas de impressão não-covalente
Polimerização por enxerto	Excerto de um filme polimérico de impressão numa partícula de suporte	Compatível com a impressão. Partículas de tamanho uniforme podem ser obtidas para colunas cromatográficas	Baixo rendimento de enxertia
Polimerização por precipitação	Polimerização entrelaçada iniciada por uma solução diluída de monómero	Microesferas uniformes são obtidas, com bons rendimentos, as microesferas são de fácil manuseamento	Os solventes precisam de ser ajustados para minimizar o consumo da molécula de impressão

1.7 Polimerização por emulsão.

Uma emulsão é a mistura de duas fases líquidas, que se forma quando dois líquidos são imiscíveis ou quase imiscíveis. Só após, a dispersão mecânica, por agitação, é que a fase menos abundante se dispersa em pequenas gotas dentro da fase mais abundante^[37].

Uma emulsão pode ser O/W (óleo em água) ou W/O, o “O” representa uma fase orgânica com baixa polaridade, por isso, imiscível em água, enquanto o “W” representa geralmente água, soluções aquosas ou um sol aquoso^[37].

A combinação do processo sol-gel com a tecnologia de emulsões água em óleo (W/O) permite a preparação de partículas de forma esférica. O fracionamento da solução sol-gel em micro-gotas, que se transformam em microreatores durante a gelificação, produz partículas de sílica de dimensões similares às dos microreatores^[38].

O processo sol-gel decorre dentro da micro-gota, que permite a solubilização simultânea dos precursores alcóxidos relativamente hidrofóbicos e das moléculas de água, as reações de hidrólise e condensação levam à formação de partículas de sílica^[19, 38].

Normalmente uma emulsão não é estável, e facilmente se transforma numa separação em camadas de duas fases líquidas, por mecanismos de floculação seguida de coalescência ou flutuação seguida de coalescência (Figura 1.11)^[37].

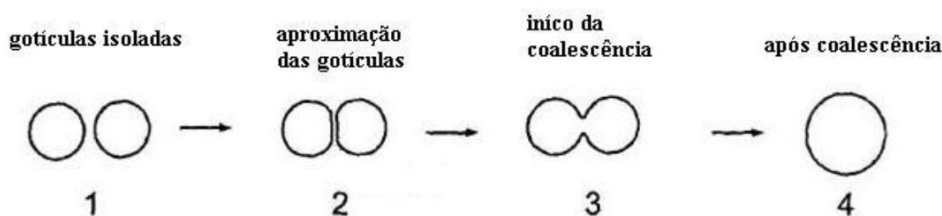


Figura 1.11. Esquema do fenómeno de coalescência.

Estes sistemas, podem ser cineticamente estabilizados pela adição de um tensioativo, assim as gotas dispersas são estabilizadas no interior de micelas de tensioativo^[37].

A combinação destas duas tecnologias permite controlar de forma independente a estrutura interna das partículas através de parâmetros de processamento sol-gel e o controlo do tamanho/forma das partículas através dos parâmetros de emulsão. Entre eles, a fase oleosa, agitação, concentração de tensioativo e razão água:óleo:tensioativo^[38].

1.7.1 Influência da fase oleosa

Autores como Fanun *et al*^[39] e Szekeres *et al*^[40] estudaram o efeito de hidrocarbonetos cíclicos na formação de emulsões. Neste estudo, indicam que a solubilização do tensioativo no óleo afeta altamente a alteração na curvatura da camada de tensioativo. Se o óleo tiver tendência para se localizar perto da camada interfacial do tensioativo na parte lipofílica da molécula de tensioativo, a curvatura será menos positiva. A curvatura pode ser definida como positiva quando a camada interfacial de tensioativo é convexa na direção da água. Por outro lado, se o óleo está localizado longe da camada interfacial de tensioativo há uma tendência para a mudança na curvatura, no sentido oposto à camada tensioativo (Figura 1.12)^[19, 41].

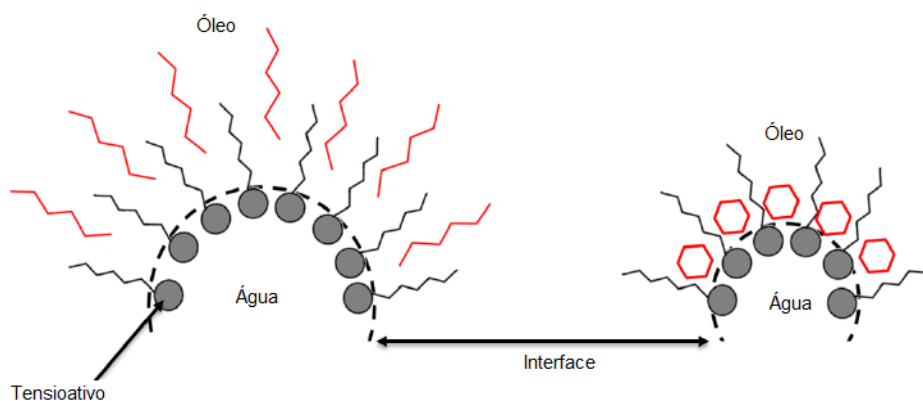


Figura 1.12. Imagem ilustrativa do comportamento da interface W/O com o tipo de cadeia da fase oleosa^[19].

Barbe *et al*^[38] demonstraram que o tamanho das partículas pode ser modulado pela escolha da fase oleosa. Concluíram que o tamanho das partículas diminui com o aumento da cadeia carbonada, diminuindo ainda mais com o uso de solventes de cadeia cíclica no lugar de alcanos. Acredita-se que a diminuição da tensão interfacial irá diminuir o tamanho das gotas, mas o mais importante, é que irá reduzir a coalescência das gotículas pelo enriquecimento da parede pelo tensioativo e assim impedir o crescimento através da agregação de partículas. Assim sendo, o tamanho das partículas pode ser controlado por prevenir a coalescência das gotículas durante a gelificação dentro da emulsão pela seleção cuidadosa da razão tensioativo:óleo e o tipo de óleo utilizado.

1.7.2 Influência da agitação

Lee et al^[42] demonstraram que a extensão do processo de agitação tem um papel importante na forma e tamanho das partículas preparadas por sistemas de emulsão. Para velocidades de agitação mais baixas, as partículas obtidas tinham formas mais irregulares e os tamanhos médios das partículas eram maiores. Enquanto as partículas preparadas a velocidade de agitação maiores apresentavam uma forma mais uniforme, esférica e de menores dimensões.

1.7.3 Influência da concentração de tensoativo

Os tensoativos são uma substância que quando presente em baixas concentrações num sistema, tem a propriedade de se adsorver na superfície ou interface do sistema e de alterar até determinado ponto, a energia dessa superfície ou interface^[43].

Os tensoativos têm uma estrutura molecular que lhes é característica, são constituídos por duas partes: uma parte hidrofóbica, designada de cauda do tensoativo e uma parte hidrofílica, designada de cabeça do tensoativo^[43].

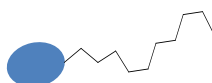


Figura 1.13. Imagem ilustrativa da estrutura de um tensoativo.

Devido a sua estrutura (figura 1.10), estas moléculas tendem a ser facilmente adsorvidas nas interfaces ar/água ou hidrocarboneto/água, para que a parte hidrofílica fique virada para a solução aquosa. Os tensoativos são classificados de acordo com a carga do grupo hidrofílico, podendo ser aniónicos, catiónicos ou zwitteriónicos^[25].

A escolha do tensoativo é crucial para o controlo da tensão superficial entre a fase aquosa e a fase orgânica, controlando, assim, o tamanho da partícula. As emulsões são sistemas dinâmicos, onde as gotas podem sofrer coalescência, isto induz o crescimento das partículas por mecanismos de agregação^[38]. A taxa de coalescência é muito variável e depende de muitos fatores, mas essencialmente da natureza e concentração do tensoativo^[44].

Com o uso de um par tensoativo/solvente adequado o tamanho das partículas pode ser controlado pela prevenção dos fenómenos de coalescência. No entanto, apesar de não existir nenhuma forma de prever qual o melhor tensoativo para determinado tamanho, sabe-se que a estrutura do tensoativo, cabeças e caudas de tensoativos maiores, produzem maior estabilização das paredes das micelas, reduzindo as trocas inter-gota, resultando na produção de partículas mais pequenas^[38, 45].

1.7.4 Razão água:óleo:tensioativo

A solubilização e as propriedades interfaciais das emulsões dependem da natureza e a concentração dos componentes. Na Figura 1.14 é visível um diagrama de fase de estabilidade (ou mapa de fase) dos parâmetros água:óleo:tensioativo^[46].

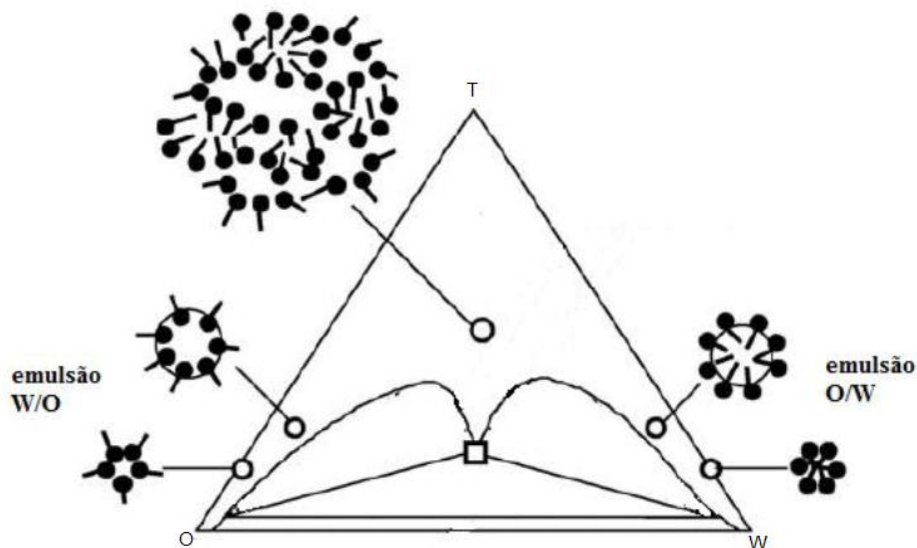


Figura 1.14. Mapa de fase da variação de água:óleo:tensioativo^[46].

No caso de emulsões W/O, para uma concentração constante de tensioativo, o tamanho das partículas de sílica geralmente diminui com o aumento da quantidade de fase aquosa. A fase aquosa fornece um meio onde as ligações de hidrogénio entre as partículas de sílica e o tensioativo é favorecido e, consequentemente, facilita a adsorção das moléculas de tensioativo à superfície das partículas de sílica para estabilizar estericamente as partículas na fase contínua de óleo^[46].

No entanto para razões baixas de tensioativo:água, manter a concentração da fase aquosa constante e fazendo aumentar a concentração de tensioativo irá levar a uma redução do tamanho das partículas, enquanto em razões elevadas a tendência oposta ocorre^[46].

1.8 Caracterização do polímero de impressão molecular

Os polímeros de rede macroscópica são difíceis de caracterizar, em grande parte por causa da sua insolubilidade e difícil tratamento, os polímeros de impressão molecular não são exceção. É possível um determinado grau de caracterização, podendo-se para isso distinguir três diferentes níveis: caracterização química; caracterização morfológica e caracterização do comportamento de impressão molecular^[17].

1.8.1 Caracterização química

Dada a sua natureza, os polímeros de impressão molecular não são geralmente passíveis de caracterização por métodos, envolvendo o estado de líquido. É conveniente utilizar métodos analíticos que permitam a utilização de amostras em estado sólido.

Técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de estado sólido possibilitam contornar a necessidade de trabalhar em solução e, portanto, permitir que os espectros de RMN de espécies insolúveis sejam adquiridos. Para polímeros de rede é possível obter informações sobre o ambiente químico da amostra. No entanto, para polímeros de impressão molecular esta técnica tem sido pouco utilizada^[17].

A microanálise elementar pode ser usada de um modo rotineiro para medir a percentagem em massa de carbono, hidrogénio, azoto, cloro, etc, dentro de amostras. Quando aplicada à análise de polímeros, a informação sobre a composição elementar obtida pode ser utilizada para calcular a composição dos monómeros do polímero. Permite ainda, a estimativa do sucesso de remoção da molécula alvo^[12, 17].

Os espectros de Infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) de polímeros de impressão são de obtenção rápida e podem ser aplicados de uma forma semelhante a microanálise elementar para extrair informação sobre a composição do polímero. Esta técnica tem particular valor quando o ambiente químico da amostra de polímero dá origem a sinais bem resolvidos. Sendo, também, possível utilizar o FTIR para obter informação sobre ligações não-covalentes, por exemplo, ligações de hidrogénio, embora a falta de sensibilidade da técnica defina limites para a sua utilidade neste espectro^[17].

1.8.2 Caracterização morfológica

A caracterização morfológica em polímeros de impressão molecular é realizada de forma semelhante à caracterização de outros sólidos porosos. Dependendo do método de análise, é possível obter informações sobre o tamanho, a forma de partícula, o volume de poros, o tamanho de poros e a distribuição de tamanho de poros do polímero^[17].

São várias as técnicas que permitem retirar informação sobre a porosidade do polímero, são disso exemplo: a porosimetria de adsorção de Azoto, a porosimetria por intrusão de mercúrio e a cromatografia inversa por exclusão de tamanho (Inverse size exclusion chromatography (ISEC)). Pode ainda testar-se a incorporação de solvente no polímero, esta técnica mede a quantidade de solvente que pode ser incorporado no polímero, e assim, estimar o volume de poros em mL/g^[17].

A distribuição de tamanhos de uma amostra de partículas pode ser determinada de várias maneiras, por exemplo: fracionamento da amostra por peneiramento e determinação gravimétrica das frações; por difração de laser; difusão dinâmica de luz, e por microscopia e análise de imagem^[12]. A microscopia pode ser utilizada numa variedade de formas distintas e permite obter informação sobre tamanho e forma da amostra de polímero.

1.8.3 Caracterização do comportamento de impressão molecular.

Após a conceção e preparação das matérias de impressão molecular é necessário verificar se o polímero possui ou não as propriedades de ligação esperadas, ou seja, se o polímero sofreu ou não a impressão. Os polímeros de impressão molecular originam dois tipos de interações: interações específicas e interações não específicas. As interações específicas referem-se aos locais de reconhecimento molecular criados durante o processo de impressão molecular, enquanto as interações não específicas devem-se a interações aleatórias com o polímero. As interações não específicas são estimadas a partir de um polímero de controlo, polímero (NIP). O NIP é preparado da mesma forma que o MIP, mas na ausência da molécula molde^[12].

Experimentalmente, a atividade de ligação da molécula alvo ao polímero impresso pode ser medido por experiências cromatográficas, por extração em fase sólida (SPE), entre outras, ao comparar a atividade do MIP com a respetiva atividade do NIP^[13].

1.9 Âmbito do estudo

Este trabalho surge como uma abordagem ao desenvolvimento de novos materiais de impressão molecular em matriz sol-gel, com utilização numa técnica recente e pouco explorada de miniaturização de processos de extração em fase sólida designado por Lab-on-valve (LOV).

Durante os últimos anos, os MIPs em matriz sol-gel têm sido amplamente utilizados como materiais sintéticos capazes de se religar à molécula alvo para os quais foram preparados. A partir de vários estudos, foi possível demonstrar o seu potencial para ser utilizado em vários campos da química (como por exemplo em química analítica), especialmente em áreas onde um elevado grau de seletividade é necessário, como extração em fase sólida, sensores, e cromatografia^[13]

O método habitual de produção de partículas MIPs em matriz sol-gel consiste na polimerização em monólito de uma mistura de monómeros funcionais, agentes de entrelaçamento, molécula molde e solvente. Este método apresenta-se como rápido eficaz e de simples execução no entanto acarreta inconvenientes. Após, a síntese do polímero este é triturado, moído e peneirado para um tamanho de partícula adequado para os estudos que serão realizados. As partículas obtidas têm forma altamente irregular e dimensões variáveis, isto reduz drasticamente a sua eficiência, dependendo do uso pretendido. Além disso, o processo de moagem e peneiração é complicado e demorado, provocando uma perda substancial de polímero útil, que pode ser estimada entre 50 e 75% da quantidade inicial de material a granel^[13, 47]

De forma a superar esses problemas, uma solução seria a combinação da tecnologia sol-gel com emulsões água em óleo (W/O): ao ser misturada com uma solução composta por um tensioativo e um solvente apolar, a solução sol-gel é fracionada em gotas de tamanho definido (Figura 1.15)^[38].

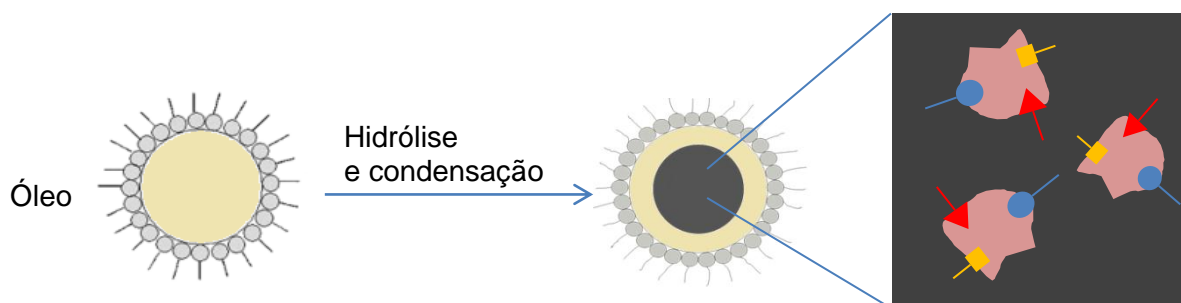


Figura 1.15. Imagem ilustrativa do processo de formação de partículas de sílica de impressão através da combinação do processo sol-gel com a técnica de emulsão W/O.

As gotas polares de sol que são dispersas no solvente apolar agem como microreatores onde a gelificação procede, resultando partículas com tamanho e forma comparáveis às gotas. Assim, pode-se controlar, de forma independente, o tamanho/forma da partícula por meio do controle do tamanho/forma das gotas através dos parâmetros de emulsão e os parâmetros de impressão pelo controle da estrutura interna das partículas através dos parâmetros de processamento sol-gel. O desafio é controlar a forma das partículas, mantendo um controle de impressão, oferecidas pela tecnologia sol-gel^[38].

As partículas MIPs obtidas pelo processo sol-gel aliado as emulsões água em óleo (W/O), foram aplicadas numa técnica recente e pouco explorada de miniaturização de processos de extração em fase sólida designado por Lab-on-valve (LOV). O LOV é uma técnica de injeção em fluxo (FI), denominada como a terceira geração de análise por FI, trabalha no modo de injeção sequencial e permite a miniaturização de operações analíticas diminuindo a quantidade de amostra e reagente necessárias à análise^[48].

1.9.1 Parâmetros da impressão molecular

De forma a verificar a aplicabilidade da impressão molecular em matriz sol-gel, escolheu-se como molécula molde o naproxeno (NAP). O ácido 2-(6-metoxi-naftil)-propanóico, é um dos principais fármacos anti-inflamatório não-esteróide. É amplamente utilizado para o tratamento da dor, inflamação e febre^[49].

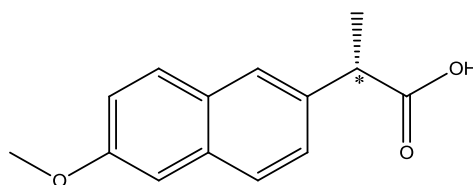


Figura 1.16. Estrutura química do naproxeno.

Como mostra a Figura 1.16, a sua estrutura química possui um átomo de carbono assimétrico α , por conseguinte, ocorre como S-naproxeno e o R-naproxeno^[49].

Tem como fórmula molecular $C_{14}H_{14}O_3$ a que corresponde uma massa molecular de 230,3 g/mol.

O naproxeno é solúvel no clorofórmio e metanol, é pouco solúvel no éter e praticamente insolúvel na água, apresentando um pK_a de 4,2 a 25°C. Este composto funde entre os 154 e os 158°C^[50].

São impostas, às empresas farmacêuticas, regras internacionais para o manuseamento de naproxeno, tanto no produto bruto como no final, pois a molécula é facilmente degradada a altas temperaturas^[51].

O monómero funcional usado no estudo como ligando não covalente para formar um complexo monómero funcional-molécula molde foi um líquido iónico (LI) com um catião imidazólio.

Os LIs são definidos como sais líquidos à temperatura ambiente e consistem predominantemente de espécies iónicas. Para além, das propriedades de solvente orgânicos convencionais, tais como as excelentes qualidades de solvatação, uma gama de viscosidade variável e um ampla faixa de temperatura, têm pressão de vapor desprezível e exibem excelente resistência química e de estabilidade térmica. Existe um elevado número, pelo menos um milhão de líquidos iónicos potencialmente disponíveis, o que permite que sejam concebidos de forma eficaz para várias aplicações^[52].

Os líquidos iónicos de catião imidazólio permitem modificações estruturais nas posições 1 e 3 do anel de imidazólio, isto permite alterações em propriedades como a miscibilidade em água ou solventes orgânicos, ponto de fusão e viscosidade. Como resultado, podem ser encontradas aplicações destes LIs em áreas de processos de separação e extração, de catálise organometálica, nanopartículas de metais de transição e eletroquímica^[53].

O líquido iónico (Figura 1.17) utilizado foi sintetizado com base no trabalho de Byunghwan^[54] e colaboradores.

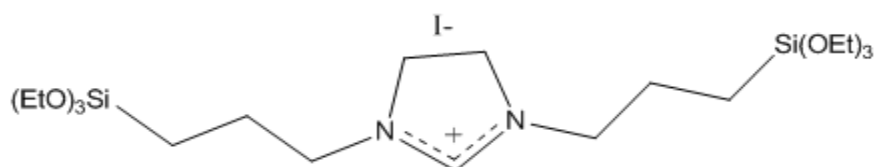


Figura 1.17. Estrutura química do líquido iónico usado como monómero funcional no processo sol-gel.

O agente de entrelaçamento (Figura 1.18) escolhido foi o tetrametilortosilicato (TMOS).

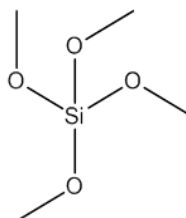


Figura 1.18. Estrutura química do TMOS.

Foi utilizado, no estudo um solvente polar, o metanol, de forma a facilitar a mistura do agente de entrelaçamento, monómero funcional e a molécula molde. Para além da homogeneização, o solvente também influencia a velocidade das reações de hidrólise e de condensação ao aumentar a atividade dos catalisadores devido às pontes de hidrogénio estabelecidas com as moléculas de solvente^[16].

A otimização das razões entre o agente de entrelaçamento e o monómero funcional para a impressão não-covalente é um processo complexo visto que a otimização da razão molécula molde e monómero funcional tem que ser considerada. No caso do nosso estudo, este processo de otimização já tinha sido realizado anteriormente por membros do grupo de investigação.

A otimização das restantes variáveis da impressão molecular em matriz sol-gel (catalisador e solvente), para posterior emulsão foi efetuada através duma abordagem empírica, variando um parâmetro de cada vez.

A reação geral do processo de síntese do polímero de impressão molecular em matriz sol-gel pode ser descrita pela Figura 1.19.

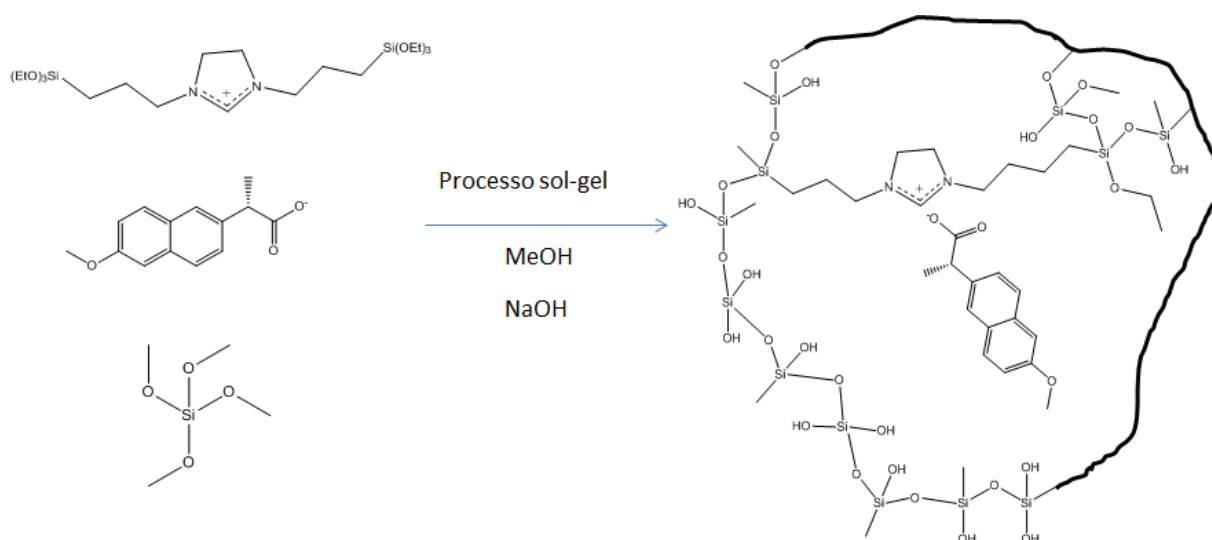


Figura 1.19. Esquema da reação do processo sol-gel do estudo.

No presente estudo o tensioativo utilizado foi o Sorbitano (Z)-mono-9-octadecenoato (SPAN80, Figura 1.20), tensioativo não-iónico, para a modulação do tamanho das gotículas. Este foi escolhido visto que é o mais adequado para a preparação de microgotículas^[55].

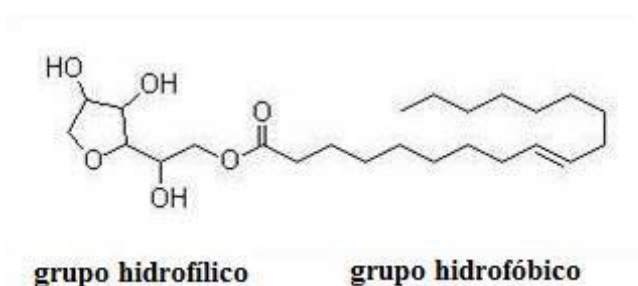


Figura 1.20. Estrutura do SPAN80.

Foram utilizados neste estudo como solventes da fase oleosa dois diferentes solventes: hexano e ciclohexano (Figura 1.21).

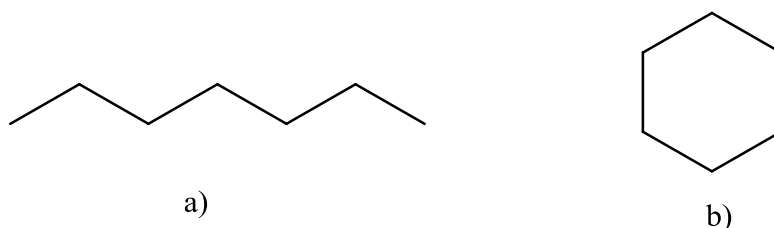


Figura 1.21. Estrutura química dos solventes usados na fase oleosa: a) hexano; b) ciclohexano.

1.9.2 Moléculas usadas no estudo de eficiência

Para além da molécula molde, já descrita anteriormente na secção anterior, foi usada a molécula de ibuprofeno como molécula análoga durante o estudo de eficiência dos polímeros sintetizados.

O ibuprofeno, ácido 2-(4-(2-metilpropil) fenil) propanóico, pertence também ao grupo fármacos anti-inflamatório não-esteróide.

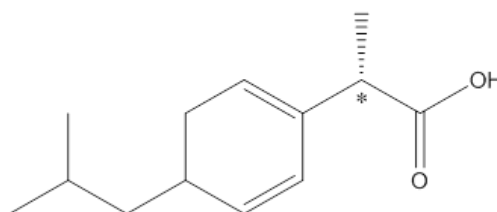


Figura 1.22. Estrutura química do ibuprofeno.

Como mostra a Figura 1.22, a sua estrutura química possui um átomo de carbono assimétrico α , por conseguinte, ocorre como S-ibuprofeno e o R-ibuprofeno. O ibuprofeno comercial é composto por uma mistura racêmica, apesar de unicamente o enantiômero S ser ativo^[56].

Tem como fórmula molecular $C_{13}H_{18}O_2$ a que corresponde uma massa molecular de 206,27 g/mol.

Tem aparência de pó cristalino branco ou cristais incolores, sendo praticamente insolúvel em água, pouco solúvel em hexano e bastante solúvel em etanol, octanol, dimetil sulfóxido e clorofórmio. A solubilidade do ibuprofeno aumenta com o pH, sendo o fármaco bastante insolúvel a valores baixos de pH. Apresenta um pK_a de 4,54 a 25 °C^[56].

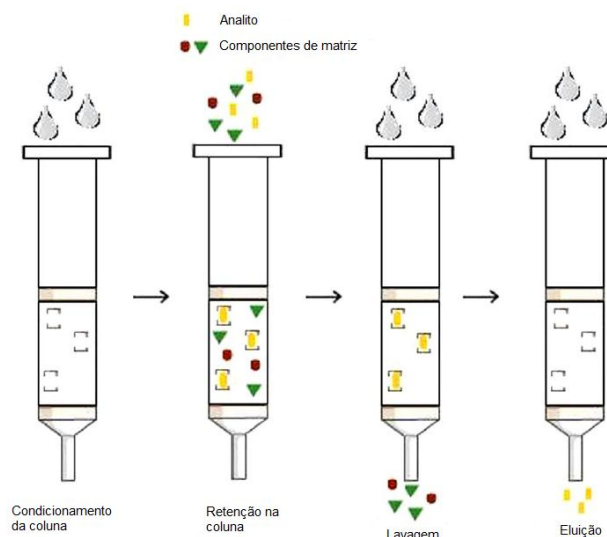
Capítulo 2

2 Técnicas de Aplicação

2.1 Extração em fase sólida (SPE)

A extração em fase sólida é um método amplamente empregue na extração e concentração de analitos com interesse de diversos tipos de matrizes. É considerado um importante método de preparação de amostras.

A SPE consiste na remoção exaustiva e em não equilíbrio de um ou mais analitos



presentes numa amostra lí quida que flui através de coluna de fase sólida. Os analitos ficam retidos na fase sólida e são posteriormente eluídos usando um solvente apropriado^[57].

Esta técnica envolve, geralmente quatro passos (Figura 2.1): condicionamento da coluna; passagem da amostra (retenção); lavagem da coluna e eluição.

Figura 2.1. Esquema do passos de extração em SPE.

O condicionamento da coluna faz-se passando pela coluna solvente de polaridade semelhante a fase estacionária. Pretende-se com isto, limpar eventuais impurezas e homogeneizar a fase estacionária para a eluição da amostra. De seguida deve passar-se o solvente usado na solução amostra. Esta segunda passagem de solvente tem como objetivo eliminar vestígios do solvente inicialmente utilizado cuja, presença condicionaria o processo de extração^[58].

Na etapa de retenção a amostra é adicionada ao dispositivo SPE. Este passo deve ser realizado de forma lenta (1-2 gotas/segundo), para que toda a fase estacionária seja uniformemente utilizada e ainda, para garantir a retenção das espécies a extrair. O volume de amostra pode variar de alguns mililitros até centenas de mililitros. Quando se utilizam volumes relativamente significativos torna-se necessário a aplicação de vácuo, sendo

necessário controlar a velocidade do fluxo uma vez que a mesma poder influenciar o fenómeno de retenção associado^[58].

Na lavagem da coluna uma porção de solução similar ao solvente da amostra é lançada na coluna com o objetivo de eliminar de forma mais eficiente as espécies interferentes contidas na fase estacionária^[58].

Por fim faz-se a eluição, este passo pretende eluir ou remover os compostos alvo retidos no enchimento. A recolha desse componente é feita mediante a passagem de um solvente (com polaridade adequada) capaz de romper a interação existente entre a fase estacionária e a espécie retida, cujo volume pode ir de algumas centenas de microlitros a alguns mililitros, consoante o teor e as características de polaridade do(s) analito(s) envolvido(s). A eluição deve ser feita com as mesmas precauções do passo da retenção (passo 2) para garantir uma recolha quantitativa do componente retido^[58].

Ao usar SPE é necessário considerar os parâmetros que influenciam a retenção dos analitos: caudal de passagem das soluções através da fase sólida, volume da amostra, massa de adsorvente e pH.

2.2 Sistema de fluxo Lab-on-valve (LOV)

O sistema lab-on-valve é uma técnica de análise por injeção em fluxo (FIA), denominada como a terceira geração de análise por FIA, recorrendo a princípios da análise por injeção sequencial e permite a miniaturização de operações analíticas diminuindo a quantidade de amostra e reagente necessárias à análise^[48].

2.2.1 Análise por injeção em fluxo (FIA)

A técnica FIA apareceu referida pela primeira vez na literatura em 1975 por Jaromir Ruzicka e Elo Hansen^[59]. Baseia-se na medição de um sinal transiente (registado de forma contínua) obtido por injeção de um segmento de amostra num fluxo transportador não segmentado em movimento contínuo. A amostra pode reagir com o transportador, dispersar-se nele ou ainda reagir com outros fluidos que sejam adicionados por confluências ao canal principal^[59, 60]. Esta técnica surge da combinação de 3 princípios: (i) injeção da amostra num fluxo transportador; (ii) tempo de permanência do segmento de amostra na tubagem reprodutível; (iii) dispersão controlada da amostra^[61].

Um sistema FIA é constituído por um sistema de propulsão, que fornece um fluxo contínuo, uma válvula para a introdução da amostra, um sistema de transporte onde ocorre

a mistura e reação, um detetor e por tubagens que fazem a ligação entre todos os componentes (Figura 2.2). O sistema FIA pode ser acoplado a vários tipos de detetores.

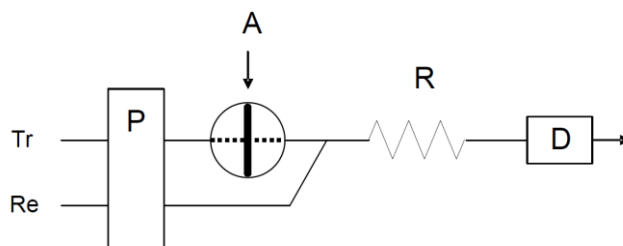


Figura 2.2. Representação esquemática de uma montagem FIA. Tr: Transportador; Re: reagente; P: Bomba Peristáltica; A: Amostra; R: Reator; D: detetor.

Devido a maior acessibilidade ao material informático, no início dos anos 90, surgiu como alternativa à metodologia FIA a técnica de análise por injeção sequencial (SIA)^[62].

O SIA é composto por uma montagem mais compacta que a dos sistemas FIA, utiliza uma seringa de propulsão controlada por um software, tem uma válvula como sistema de seleção multiportas que permite o manuseamento de vários reagentes/amostras. Os reagentes e amostra são inseridos no sistema e armazenados num reservatório por zonas, sendo posteriormente direcionados para o detetor por reversão do fluxo. Este sistema permite acomodar reações que exigem pequenos volumes e controlo restrito de tempo reacional^[63].

A miniaturização dos sistemas SIA com a criação de uma unidade especial, feita de plástico com microcanais gravados nesta peça, incorporada sobre uma válvula de seleção e designada por lab-on-valve. Esta foi a técnica usada no estudo e será descrita na seção seguinte.

A Figura 2.3 mostra a cronologia de aparecimento das diversas técnicas de análise em fluxo.

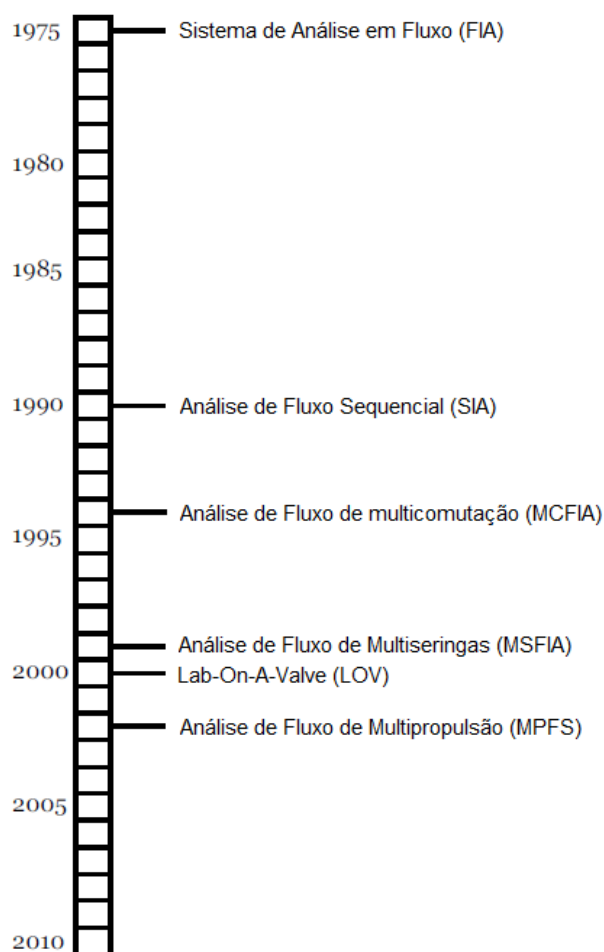


Figura 2.3. Cronologia dos sistemas de análise em fluxo^[64].

2.2.2 Sistemas lab-on-valve

Durante a última década, a miniaturização ganhou maior interesse em vários domínios analíticos, tendo como objetivo final a diminuição de custos, de reagentes, solventes e resíduos gerados^[65].

A técnica lab-on-valve, proposta por J. Ruzicka^[66] não só oferece um caminho promissor para a miniaturização da manipulação de fluidos relativamente ao sistema SIA convencional, mas oferece também grandes potencialidades para a monitorização “*in situ*” e para a automatização de várias operações^[48].

O sistema LOV consiste numa peça monolítica com microcanais gravados no topo de uma válvula de multiposição, concebido para integrar todas as operações necessárias à análise, sendo por essa razão denominado Lab-on-valve. Este sistema inclui locais de mistura de reagentes e amostra, canais para diluição de amostra, zonas de possível sobreposição reagente/amostra e extração. De facto, a unidade LOV pode ser concebida

para incorporar sistemas de deteção, ou seja, dispositivos óticos (por exemplo: espectrofotómetros, luminómetros ou espectrofluórímetros) onde a comunicação com o detetor é feita por fibras óticas^[48].

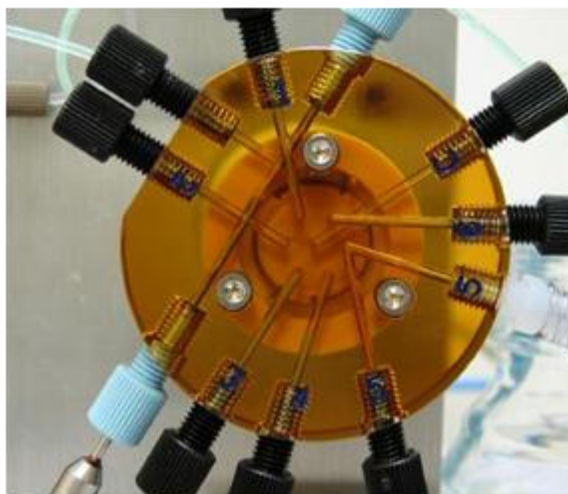


Figura 2.4. Dispositivo LOV.

O canal central do sistema LOV, ao qual todas as outras portas laterais são ligadas (uma de cada vez), é usado para comunicar com o sistema de seringas, que fornece a força motriz para as manipulações fluídicas. Os microcanais gravados permitem a miniaturização de várias operações fluídicas, incluído a introdução no sistema da amostra, solventes e partículas^[48].

2.2.3 Sistemas lab-on-valve associado ao conceito de “*bead injection*”

O conceito de “*Bead injection*” consiste na injeção/introdução de partículas funcionalizadas num sistema de fluxo, permitindo a formação de uma microcoluna no interior do sistema^[61, 67].

A presença de uma fase sólida no sistema de injeção sequencial vai trazer consigo novas propriedades ao sistema, entre as quais duas devem ser destacadas: primeiro, o sólido pode funcionar como uma fase sólida extratora, onde o analito é adsorvido, e assim separado da matriz de amostra. Isto vai aumentar a sensibilidade e seletividade da técnica. Em segundo lugar, a fase sólida, pode também atuar como um reagente sólido. À medida que o analito é adsorvido promove alterações físicas que podem ser monitorizadas por meio de um detetor adequado, sendo por vezes necessária a adição de reagentes auxiliares^[67].

A fase sólida pode ser renovada automaticamente após cada ciclo de análise, evitando a perda na eficiência de retenção devido a eluição de grupos funcionais responsáveis pela retenção do analito ou a contaminação por componentes da amostra

devido a extrações consecutivas (efeito “*carryover*”). Permite ainda evitar a contração ou expansão do leito de adsorvente e a adsorção de espécies interferentes^[67, 68].

Um dos maiores desafios colocados ao “*bead injection*” é a manipulação confiável e repetível das partículas no interior do sistema de fluxo com protocolos automáticos. Trabalhos anteriores sobre o tópico^[69-72] eram consensuais sobre os requisitos que devem ser cumpridos pelas partículas de modo a obter suspensões homogêneas. As suspensões de partículas deviam ser preparadas em solução aquosa, alcoólica ou solvente hidro-alcoólico, deviam ainda ser de forma esférica e distribuição de tamanhos uniformes. No entanto, no estudo de Oliveira et al^[73] foi observado que utilizando um passo de resuspensão antes da aspiração promovendo a fluidização das partículas era eficaz para a obtenção de empacotamentos repetíveis mesmo quando se utilizavam partículas de forma irregular.

O conceito “*bead injection*” é facilmente miniaturizado no sistema lab-on-valve o que permite diversas aplicações dentro do campo da química analítica.

2.2.4 Instrumentação lab-on-valve

A montagem referente ao sistema de fluxo lab-on-valve é constituída por um módulo de propulsão e por um módulo LOV controlados por um software escrito/desenvolvido em QuickBasic 4.5.

O módulo de propulsão é um sistema multi-seringa da marca Crison (modelo BU 4 S). Este sistema consiste numa bomba de pistão multicanal contendo 4 seringas (Figura 2.5), ligadas a uma única barra que é movida por um único motor. No topo de cada seringa existe uma válvula de comutação de três vias (NResearch, Caldwell), que define dois caminhos para o fluxo oriundo de cada seringa: o reservatório das soluções (posição “*off*” ou posição 0) ou o sistema de fluxo (posição “*on*” ou posição 1^[64]). O fluxo em cada canal depende do volume da seringa utilizada, tendo sido utilizado neste trabalho um equipamento com um motor de 10000 passos acoplado com uma seringa de 2500 µL.

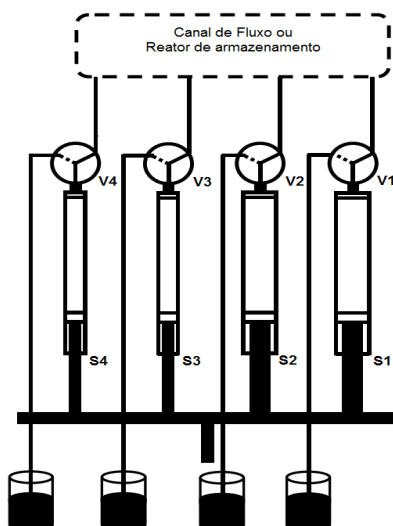


Figura 2.5. Representação esquemática de uma bureta multi-seringa (v_i - válvula de comutação; s_i - seringa; posição on linha sólida; posição off linha a tracejado)^[64].

O módulo LOV consiste numa estrutura monolítica (Figura 2.6) constituída por polieterimida (PEI) com 10 microcanais gravados na mesma (Ideia.M., Porto, Portugal), montada numa válvula multi-posição de oito portas da Crison (modelo VA 2 SW).

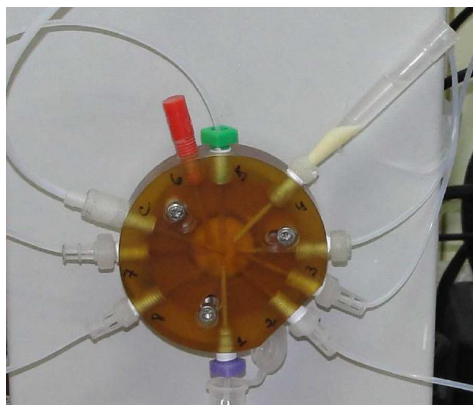


Figura 2.6. Estrutura monolítica do módulo LOV usado.

O canal central está ligado à multi-seringa através do canal central (com uma capacidade de 4 mL). As portas laterais permitem a introdução no sistema de soluções e suspensões bem como um canal de descarte (esgoto). O rotor central, cuja posição é controlada por computador, assegura a comunicação entre o canal central e os canais laterais.

A direção e a velocidade do movimento do pistão, a posição da válvula de comutação assim como a posição da válvula multi-posição são controlados por interface com o computador através de uma porta RS-232.

As conexões entre os módulos e componentes do sistema LOV é feita por tubos de politetrafluoroetileno (PTFE, da Omnifit) com diâmetro interno de 0,8 ou 1,5 mm. As

tubagens de diâmetro mais largo são usadas para conectar as seringas com o reservatório de solução transportadora e também no reator de armazenamento, de modo a prover menor resistência na aspiração de solução transportadora a fluxos mais elevados e aumentar a capacidade de armazenamento para evitar a contaminação do conteúdo da seringa. Todas as outras conexões são feitas com tubagens de PTFE de diâmetro de 0,8 mm.

Capítulo 3

3 Procedimento experimental

3.1 Material, reagentes e instrumentação

Para além do material de uso corrente em laboratório, foram também utilizado tubos “*ependor*” de 1,5 mL, “*vials*” de 7 mL, 22 mL (Supelco), cartuchos de soxhlet (de celulose, 33mm x 80mm, Whatmam), barras magnéticas (12 mm x 4,5 mm, Kartell), agitador magnético (Falc – modelo F60), agitador de vórtex (IKA – modelo Yellow Line, TTS2) manta de aquecimento (Labmaster - isopad), medidor de pH (Metrohm – modeo pH meter 654), agitador orbital (SK-330-Pro), bomba de vácuo (VWR – Vacuum Gas Pump).

Ao longo de todo o estudo, utilizaram-se os seguintes reagentes: N-(3-trietoxisililpro-4,5-diidroimidazole ($C_{12}H_{26}N_2O_3Si$, 97%, ABCR), 3-iodopropiltrimetoxisilano ($C_6H_5IO_3Si$, , ABCR), acetonitrilo (CH_3CN , J.T.Baker), Naproxeno ($C_{14}H_{14}O_3$, 98%, Aldrich), ibuprofeno ($C_{13}H_{18}O_2$, Sigma-Aldrich), Metanol ($MeOH$, $\geq 99,8\%$, VWR Prolabo), tetrametoxisilano (TMOS, $\geq 98,0\%$, Fluka), ácido fórmico ($HCOOH$, $\geq 98\%$, Fluka), Ácido acético (CH_3COOH , Pronolab), Hidróxido de sódio ($NaOH$, Merk), acetato de sódio, ciclohexano (C_6H_{12} , $\geq 99,5\%$, Chem-Lab), hexano (C_6H_{14} , $\geq 95\%$, Chem-Lab), sorbitano (Z)-mono-9-octadecenoato (SPAN 80, Fluka).

Foram utilizadas partículas comerciais OASISTM HLB e materiais de impressão molecular para fármacos anti-inflamatórios não esteróides (SupelMIP NSAIDs) e ainda materiais de impressão molecular sintetizados no grupo de investigação.

Durante o estudo foram utilizados dois HPLCs diferentes, um usado no estudo de SPE realizado nas infraestruturas da Faculdade de Ciências e um segundo usado no estudo efetuado por LOV nas instalações da Faculdade de Farmácia da universidade do Porto. As características dos dois instrumentos encontram-se resumidas na Tabela 3.1.

Tabela 3.1. Características dos HPLCs utilizados.

	Estudo SPE	Estudo LOV
Marca	Perkin Elmer	Jasco
Bomba	Perkin Elmer serie 200 pump	Jasco PU-2080 Plus
Detetor	Perkin Elmer serie 200 UV/Vis Detector	Jasco MD -2015 Plus
Coluna	Ultima HP C8 3u/150-4,6mm	Cromolith performance / RP-18e / 100-4,6 mm
Eluente	70% MeOH : 30% H_2O com 2% CH_3COOH	70% MeOH : 30% H_2O com 2% CH_3COOH
Fluxo (mL/min)	0,8	1,5
Comprimento de onda (nm)	220	220

3.2 Síntese do monómero funcional^[54]

Num balão de fundo redondo de 3 tubuladuras adicionou-se 10mmol ($\approx 2,717$ mL) de N-(3-trietoxisililpropil)-4,5-diidroimidazole, 10mmol ($\approx 1,975$ mL) de 3-iodopropiltrimetoxisilano e 10mL de acetonitrilo seco (a reação de síntese é demonstrada na Figura 3.1). Deixou-se a reagir em refluxo, com atmosfera de Azoto e com agitação durante 14h num banho de temperatura controlada de 70°C (montagem segundo a Figura 3.2). Sempre que necessário adicionou-se acetonitrilo seco. No fim das 14h de reação levou-se ao evaporador rotativo. O líquido iónico foi guardado em fluxo de azoto.

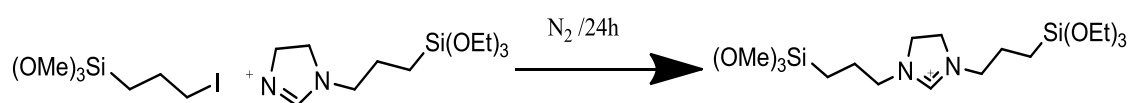


Figura 3.1. Esquema da reação de síntese do iodeto de 1-(trietoxisililpropil)-3-(trimetoxisililpropil)-4,5-dihidroimidazólio.

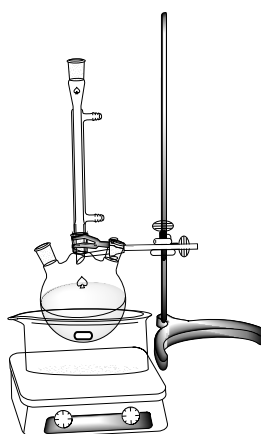


Figura 3.2. Esquema da montagem para a síntese do monómero funcional.

3.3 Preparação de partículas esféricas de impressão molecular

O procedimento experimental para a preparação de partículas esféricas foi baseado no estudo de Barbé et al.^[38] e encontra-se resumido na Figura 3.3.

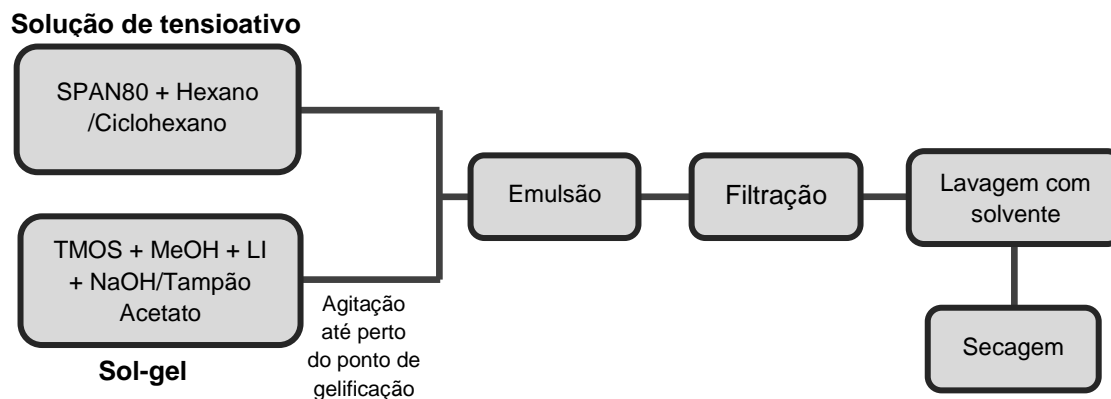


Figura 3.3. Esquema ilustrativo do procedimento experimental para preparação de partículas de sílica esféricas.

A solução sol-gel, foi tipicamente preparada pela combinação de TMOS, MeOH, monómero funcional, uma solução aquosa (NaOH ou tampão acetato) e a molécula molde, isto no caso de material MIP. O NIP foi preparado nas mesmas condições com a exceção da molécula molde.

A solução foi deixada em agitação até perto do ponto de gelificação. Nessa altura, foi preparada uma solução de tensioativo (SPAN80) num solvente não-polar, ciclohexano ou hexano, seguido de homogeneização, a 8000 rpm, para formar uma solução tensioativo/solvente transparente. A solução sol-gel foi, então adicionado à solução de tensioativo e a emulsão resultante foi agitada a 8000 rpm durante 5 min. As concentrações de solução tensioativo experimentadas foram 0,05 g/mL (A), 0,10 g/mL (B) e 0,20 g/mL (C).

As razões de volumes de solução de tensioativo e sol-gel utilizadas foram 10, 20 e 40.

A suspensão de partículas formada foi filtrada e lavada com o solvente para remover o tensioativo. As partículas resultantes foram, então, secas à temperatura ambiente.

3.3.1 Preparação de MIPs

As razões molares utilizadas para preparação dos materiais de sílica de forma esférica estão descritas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2. Razões Molares dos diferentes componentes da solução sol-gel para a preparação de partículas de sílica de esférica.

Solução	Molécula	Monómero	TMOS	Solução aquosa	MeOH	
sol-gel	molde	funcional				
A	0,0674	0,151	1	[NaOH]=1X10 ⁻⁵	2,26	34,7
B/C	0,0674	0,151	1	Tampão Acetato	2,26	34,7
D	0,067	0,151	1	[NaOH]=1X10 ⁻⁵	2,26	14,9
E/F	0,0674	0,151	1	[NaOH]=1X10 ⁻⁵	2,26	54,6
H	0,0674	-----	1	[NaOH]=1X10 ⁻⁵	2,26	14,9

As misturas sol-gel foram preparadas em tubos de centrífuga de 50 mL e respeitando as razões molares da tabela.

Na preparação das soluções sol-gel começou-se por pesar para um vial de 7 mL a molécula molde onde se adicionou o MeOH e a solução aquosa (NaOH ou uma solução tampão acetato). Adicionou-se esta solução a um tubo de centrífuga, onde previamente fora pesado o monómero funcional. Por fim, adicionou-se o TMOS, fechou-se o frasco com uma tampa perfurada de forma a permitir a lenta evaporação do MeOH e deixou-se em agitação.

As soluções B e C diferiram no tempo que foram deixadas em agitação. A solução foi deixada em agitação durante um maior período de tempo.

As soluções E e F apenas diferem no facto de o líquido iónico usado na preparação das partículas I ter sido preparado com um líquido iónico de preparação mais recente.

A adição de reagente deu-se na mesma ordem para todos as soluções sol-gel com exceção na solução sol-gel H no que diz respeito a adição de monómero funcional.

3.3.2 Preparação de NIPs

A preparação de NIPs foi efetuada da mesma forma que os MIPs com a única exceção da adição de naproxeno. As razões molares utilizadas na preparação das soluções sol-gel foram as mesmas utilizadas na preparação dos MIPs, tal como os volumes utilizados.

Não foi conseguida a preparação no NIP A, pelo que a sua avaliação não foi efetuada.

3.4 Preparação de partículas irregulares de impressão molecular

O procedimento experimental para a preparação de partículas irregulares encontra-se resumido na Figura 3.4.

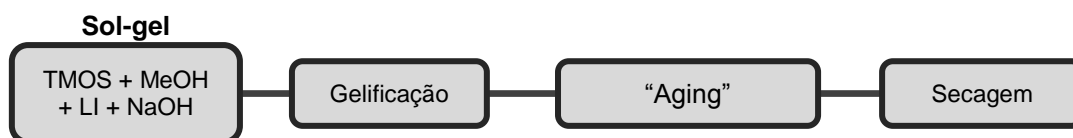


Figura 3.4. Esquema ilustrativo do procedimento experimental para preparação de partículas de sílica irregulares.

O MIP foi preparado pela combinação de TMOS, MeOH, monómero funcional, uma solução aquosa de NaOH e a molécula molde. O NIP foi preparado nas mesmas condições com a exceção da molécula molde. As soluções foram deixadas em agitação até a formação de um monólito.

Após a formação do monólito os materiais de sílicas foram moídos e peneirados, para se obter partículas de dimensões inferiores a 45 μm .

3.4.1 Preparação de MIPs/NIPs

As razões molares utilizadas para preparação dos materiais de sílica irregulares estão descritas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3. Razões Molares dos diferentes componentes da solução sol-gel para a preparação de partículas de sílica irregulares.

Solução	Molécula	Monómero	TMOS	Solução aquosa	MeOH
sol-gel	molde	funcional			
G	0,0674	0,151	1	[NaOH]=1X10 ⁻⁵	2,26
					54,6

As misturas sol-gel foram preparadas em tubos de centrífuga de 50 mL e respeitando as razões molares da tabela.

Começou-se por pesar para um vial de 7 mL a molécula molde onde se adicionou o MeOH e a solução de hidróxido de sódio. Adicionou-se esta solução a um tubo de centrífuga, onde previamente fora pesado o monómero funcional. Por fim, adicionou-se o TMOS, fechou-se o frasco com uma tampa perfurada de forma a permitir a evaporação do MeOH e deixou-se em agitação até a solidificação. Após a qual o monólito de polímero obtido foi moído e peneirado.

A preparação do NIP foi efetuada da mesma forma que os MIP com a única exceção da adição de naproxeno. As razões molares utilizadas na preparação da solução sol-gel foram as mesmas utilizadas na preparação dos MIPs, tal como os volumes utilizados.

3.5 Lavagem das partículas de impressão molecular

Todas as partículas obtidas foram submetidas a uma extração soxhlet por forma a extrair a molécula de naproxeno usada durante a síntese. Como forma de garantir que as todas as partículas era sujeitas as mesmas condições foram extraídas tanto as partículas MIPs como as partículas NIPs.

A extração foi feita usando como solvente extrator uma solução de 10% de ácido fórmico em MeOH (v/v). Durante a lavagem foram sendo retiradas tomas de 1 mL de líquido extrator e injetados no HPLC para controlar a extensão da extração.

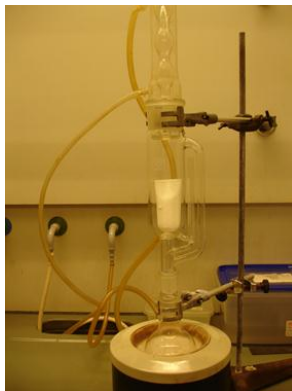


Figura 3.5. Montagem da extração sohlet.

3.6 Caracterização morfológica por Microscopia

De modo a obter uma análise morfológica das partículas sintetizadas recorreu-se a microscopia ótica. Utilizou-se um microscópio ótico BX51 da Olympus, as imagens foram adquiridas com uma câmara digital Olympus DP71 e processadas com o software *CellA*.

Para a visualização e análise das partículas de sílica, dos MIPs e NIPs foram efetuadas várias tomas do universo das partículas obtidas para a obtenção de resultados representativos.

3.7 Caracterização por FTIR - ATR

Para obter a análise caracterização das partículas sintetizadas foi utilizado um espectrofotómetro ATR Bruker Tensor 27, com cristal de diamante. Foram feitos 30 scans numa gama de número de onda entre os 550 cm^{-1} até aos 3500 cm^{-1} .

Para a análise das partículas de sílica, foram feitas tomas das partículas MIP e NIP obtidas. Foram também feitas tomas do monómero funcional, para comparação dos sinais obtidos.

3.8 Caracterização por extração em fase sólida

Pesou-se 300 mg de partículas de sílica para um cartucho de SPE. Seguidamente fez-se passar pela coluna porções de 5 mL de uma solução de 10% de ácido fórmico em MeOH (v/v) e recolheu-se 1 mL de eluato e controlou-se por HPLC se a coluna estava completamente limpa.

Em seguida condicionou-se a coluna com 1 mL de MeOH. Carregou-se a coluna com 1 mL de solução amostra e recolheu-se o eluato. Foram utilizadas duas soluções amostra

diferentes, a primeira, em solução metanólica com uma concentração de 3 ppm de naproxeno e 3 ppm de ibuprofeno. A segunda, uma solução aquosa com 10% de MeOH e com uma concentração de 3 ppm de naproxeno e 3 ppm de ibuprofeno. Lavou-se o leito adsorvente com 1mL de H₂O e recolheu-se o eluato. De seguida, fez-se passar 1 mL de MeOH e recolheu-se o eluato. Por fim, para eluição total dos compostos, adicionou-se um eluente com mais força de eluição, neste passo foram usadas duas soluções diferentes, a primeira, uma solução 10% de ácido fórmico em MeOH (v/v) e uma segunda, uma solução de 1% CH₃COOH em MeOH. Este passo foi repetido até à eluição completa dos fármacos, após cada eluição foi recolhido o respetivo eluato.

Todos os eluatos recolhidos foram analisados por HPLC.



Figura 3.6. Montagem do sistema de extração SPE.

3.9 Sedimentação das partículas de sílica sintetizadas

Para possível utilização das partículas sintetizadas pela técnica de fluxo Lab-on-valve foi necessário um processo de sedimentação para separação/obtenção das partículas de maiores dimensões.

Num vial de 22 mL adicionou-se, as partículas de sílica (cerca de 500 µg) e 5mL de MeOH e levou-se ao banho de ultrasons durante 1 minuto para separação das partículas. Deixou-se a solução repousar e, retiraram-se as partículas evitando os grumos para um novo vial de 22mL.

Adicionou-se 20 mL de uma solução de 80% MeOH e agitou-se, deixou-se repousar durante 5 min e retirou-se o sobrenadante. Este processo foi repetido 10 vezes.

3.10 Aplicação das partículas na técnica de fluxo lab-on-valve

A válvula do sistema LOV é constituída, como já foi dito, por 10 canais, na Figura 3.7 é possível observar a descrição de utilização de cada uma deles.

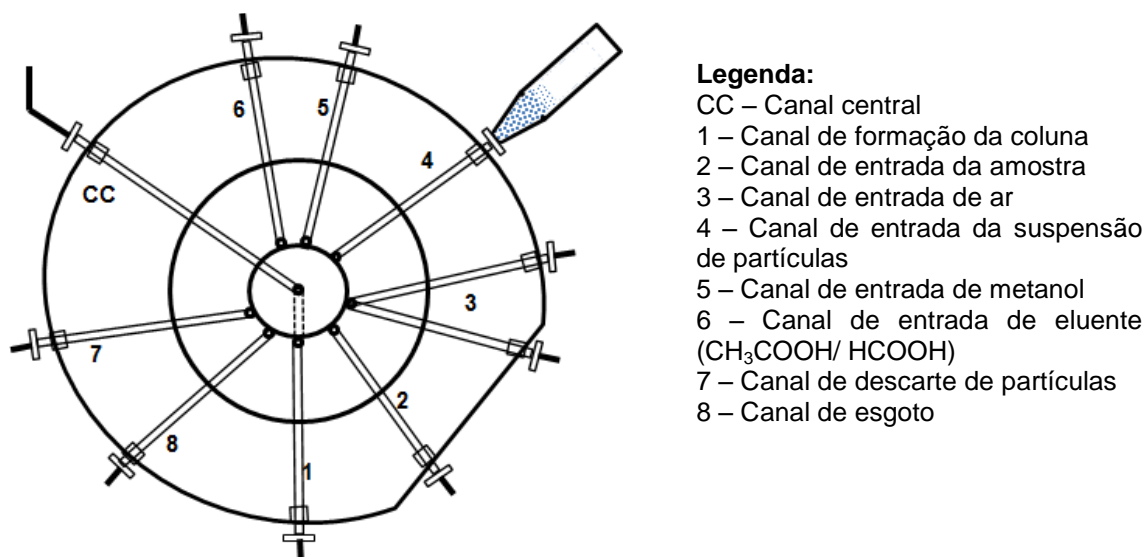


Figura 3.7. Esquema da estrutura da peça do módulo LOV.

No canal/porta 1 foram retidas as partículas que constituem a fase sólida, ocorrendo aqui a formação da coluna extratora. A amostra foi aspirada para o sistema através da porta 2. O ar pode ser introduzido no sistema pela porta 3 (que é constituída por dois canais interligados). Na porta 4 esteve encaixada uma ponta de micropipeta onde foi colocada a suspensão das partículas para posterior aspiração das mesmas e envio para a porta 1. Pela porta 5 deu-se a entrada no sistema do MeOH e na porta 6 a entrada da solução 1% ácido acético em metanol. A porta 7 serviu para o descarte das partículas da fase sólida e a porta 8 como esgoto ao sistema. Entre os canais 6 e 7 encontrava-se o canal central (cc) que faz a ligação entre a válvula multi-posição e o reator de armazenamento e consequentemente com a multi-seringa.

As partículas de fase sólida usadas durante o estudo encontram-se descritas na Tabela 3.4:

Tabela 3.4. Partículas usadas na técnica de fluxo lab-on-valve.

Partículas	Características
MIP A	Partículas esféricas MIP sol-gel
MIP 525	Partículas MIP sol-gel (sintetizados por outros membros do grupo de investigação)
MIP PF/ NIP PF	Partículas MIP de “ <i>Pore Filling</i> ” (sintetizados por outro membro do grupo de investigação)
SupelMIP™-NSAIDs	Partículas MIP comerciais para extração de fármacos anti-inflamatórios não esteróides
OASIS™ HLB	Partículas comerciais usadas na extração de compostos polares e apolares.

Nas seções seguintes é feita uma descrição detalhada de todo o protocolo experimental aplicado para a extração em fase sólida.

Formação da coluna extratora

Começou-se por pesar 30 mg de partículas de fase sólida para um tubo “*eppendorf*” e adicionou-se 300 µL de solução 50% MeOH/50% H₂O, esta suspensão foi colocada na porta 4. Seguidamente aspirou-se 550 µL de MeOH pela porta 5 a um caudal de 2,5 mL/min. Inverteu-se o sentido do movimento do pistão associado à seringa e enviaram-se 125 µL do MeOH a um caudal de 5 mL/min através da porta 4, onde se encontrava a suspensão de partículas da fase sólida, ocorrendo a ressuspensão/dispersão das partículas. De seguida, inverteu-se novamente o sentido do fluxo e alterou-se a posição da válvula de três vias, encheu-se a seringa com um volume de 1050 µL de transportador (água ultra-pura) a um caudal de 5 mL/min, aspirando diretamente do reservatório de transportador. Aspirou-se seguidamente 175 µL da suspensão das partículas de fase sólidas a um caudal de 0,5 mL/min e, após mudança do canal central para a porta 1 e inversão do sentido do fluxo, enviou-se 1000 µL a um caudal de 2 mL/min, formando assim a coluna. Após mudança de canal aspirou-se 200 µL de MeOH com um caudal de 2 mL/min, inverteu-se o sentido e enviou-se o excedente de partículas para a porta 7 a um caudal de 5 mL/min. Na Tabela 3.5 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente à aspiração das partículas da fase sólida e formação da microcoluna de extração.

Tabela 3.5. Protocolo experimental do carregamento das partículas da fase sólida.

Descrição	Porta	Volume (µL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Aspiração metanol	5	550	2,5	a	1
Ressuspensão das partículas	4	125	5	b	1
Enchimento das seringas	4	1050	5	a	0
Aspiração das partículas	4	175	0,5	a	1
Formação da coluna	1	1000	2	b	1
Aspiração de metanol	5	200	2	a	1
Rejeição de partículas em excesso	7	850	5	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Condicionamento da coluna extratora

Começou-se por aspirar 100 µL de ar pela porta 3 a um caudal de 2 mL/min, seguidamente encheu-se a seringa com um volume de 1500 µL proveniente do reservatório do transportadora um caudal de 2 mL/min. O passo seguinte foi o de enviar, após inversão do fluxo, 200 µL do transportador diretamente para o reservatório (*“dummy step”*), para posicionamento do pistão multi-seringa. Enviou-se para a porta 1 1100 µL do conteúdo do canal central com um caudal de 0,5 mL/min e, por fim, enviou-se para o esgoto 300 µL com um caudal de 5 mL/min. Na Tabela 3.6 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente ao condicionamento da coluna extratora.

Tabela 3.6. Protocolo experimental do condicionamento da coluna de extração.

Descrição	Porta	Volume (µL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Aspiração do ar	3	100	2	a	1
Enchimento da seringa	2	1500	2	a	0
<i>“Dummy step”</i>	2	200	5	b	0
Envio do conteúdo do cc	1	1100	0,5	b	1
Lavagem do canal central	8	300	5	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Carregamento da amostra

Após ligação do canal central à porta 3, aspirou-se 400 µL de ar a um caudal de 2 mL/min para o reator de armazenamento. De seguida, mudou-se para a porta 2 e aspirou-se 1000 µL de amostra a um caudal de 2 mL/min também para o reator de armazenamento. O passo seguinte foi o de enviar, após inversão do fluxo, 150 µL do transportador diretamente para o reservatório (“*dummy step*”) do mesmo, para posicionamento do pistão multi-seringa. O canal central foi ligado à porta 1 e enviou-se 1200 µL do conteúdo (amostra e ar) a um caudal de 0,5 mL/min, fazendo-se a recolha da primeira alíquota para um “*ependorf*”. Encheu-se a seringa com 1500 µL a partir do reservatório do transportador e ligou-se o canal central a porta 8, ocorrendo a rejeição do mesmo volume para o esgoto.

Na Tabela 3.7 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente ao carregamento da amostra.

Tabela 3.7. Protocolo experimental do carregamento da amostra.

Descrição	Porta	Volume (µL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Aspiração do ar	3	400	2	a	1
Aspiração da amostra	2	1000	2	a	1
“ <i>Dummy step</i> ”	2	200	5	b	0
Envio amostra para a coluna	1	1200	0,5	b	1
Enchimento da seringa	1	1500	5	a	1
Lavagem do canal central	8	1500	5	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Eluição com H₂O

Começou-se por aspirar 400 µL de ar pela porta 3 a um caudal de 2 mL/min, seguidamente encheu-se a seringa com um volume de 1600 µL a um caudal de 2 mL/min. O passo seguinte foi o de enviar, após inversão do fluxo, 200 µL do transportador diretamente para o reservatório (“*dummy step*”) do mesmo, para posicionamento do pistão multi-seringa.

O canal central foi ligado à porta 1 e enviam-se 800 µL do conteúdo do cc (transportador e ar) a um caudal de 0,5 mL/min, fazendo-se a recolha da segunda alíquota para um “*ependorf*”. Por fim, ligou-se o canal central à porta 8 e enviam-se 1000 µL de

transportador para o esgoto com um caudal de 5 mL/min. Na Tabela 3.8 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente a eluição da coluna extratora com H₂O.

Tabela 3.8. Protocolo experimental da eluição com H₂O.

Descrição	Porta	Volume (μL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Aspiração do ar	3	400	2	a	1
Enchimento da seringa	2	1600	2	a	0
<i>“Dummy step”</i>	2	200	5	b	0
Envio transportador mais ar para a coluna	1	800	0,5	b	1
Lavagem do canal central	8	1000	5	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Eluição com MeOH

Após ligação do canal central à porta 3, aspirou-se 400 μL de ar a um caudal de 2 mL/min para o reator de armazenamento. De seguida, mudou-se para a porta 5 e aspirou-se 6000 μL de amostra a um caudal de 2 mL/min também para o reator de armazenamento. O passo seguinte foi o de enviar, após inversão do fluxo, 150 μL do transportador diretamente para o reservatório (*“dummy step”*) do mesmo, para posicionamento da seringa. O canal central foi ligado à porta 1 e enviou-se 800 μL do conteúdo do canal cc MeOH e ar) a um caudal de 0,5 mL/min, fazendo-se a recolha da terceira alíquota para um *“ependorf”*. Encheu-se a seringa com 1500 μL a partir do reservatório do transportador e ligou-se o canal central a porta 8, ocorrendo a rejeição do mesmo volume para o esgoto.

Na Tabela 3.9 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente a eluição da coluna extratora com MeOH.

Tabela 3.9. Protocolo experimental da eluição com MeOH.

Descrição	Porta	Volume (µL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Aspiração do ar	3	400	2	a	1
Aspiração do metanol	5	600	2	a	1
“Dummy step”	5	200	5	b	0
Envio metanol para a coluna	1	800	0,5	b	1
Enchimento da seringa	1	1500	5	a	0
Lavagem do canal central	8	1500	5	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Eluição com uma solução de 1% CH₃COOH em MeOH

Após ligação do canal central à porta 3, aspirou-se 400 µL de ar a um caudal de 2 mL/min para o reator de armazenamento. De seguida, mudou-se para a porta 6 e aspirou-se 600 µL de eluente a um caudal de 2 mL/min também para o reator de armazenamento. O passo seguinte foi o de enviar, após inversão do fluxo, 150 µL do transportador diretamente para o reservatório (“dummy step”) do mesmo, para posicionamento da seringa. O canal central foi ligado à porta 1 e enviou-se 800 µL do conteúdo do cc (eluente e ar) a um caudal de 0,5 mL/min, fazendo-se a recolha da alíquota para um “eppendorf”. Encheu-se a seringa com 1500 µL a partir do reservatório do transportador e ligou-se o canal central à porta 8, ocorrendo a rejeição do mesmo volume para o esgoto.

Este protocolo foi repetido duas vezes, de modo a fazer uma eluição completa da amostra, assim, foram recolhidas a quarta e a quinta alíquota. Na Tabela 3.10 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente a eluição da coluna extratora com uma solução de 1% CH₃COOH em MeOH.

Tabela 3.10. Protocolo experimental da eluição com uma solução de 1% CH₃COOH em MeOH.

Descrição	Porta	Volume (μL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Aspiração do ar	3	400	2	a	1
Aspiração do eluente	6	600	2	a	1
"Dummy step"	6	200	5	b	0
Envio eluente para a coluna	1	800	0,5	b	1
Enchimento da seringa	1	1500	5	a	1
Lavagem do canal central	8	1500	5	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Descarte das partículas empacotadas na coluna

Aspirou-se 1000 μL de transportador diretamente do reservatório a um caudal de 5 mL/min para enchimento da seringa. De seguida, moveu-se o canal central para a porta 5 e são aspirados 250 μL de MeOH 2,5 mL/min. Invertendo o sentido do fluxo e ligando o canal central à porta 1, enviou-se 200 μL do MeOH aspirando-o a um caudal de 2 mL/min para humedecimento das partículas empacotadas. Invertendo novamente o sentido, aspirou-se as partículas para o reator de armazenamento, num volume total de 500 μL a um caudal de 5 mL/min. Seguiu-se o descarte de 1350 μL da suspensão de partículas a 5 mL/min, mudando o canal central para a porta 8 (esgoto) e invertendo o sentido da seringa para propulsão. O canal central deslocou-se para a porta 1 e os restantes 200 μL são enviados para o canal para realizar a limpeza do mesmo. Na Tabela 3.11 apresenta-se um resumo do protocolo experimental referente ao descarte das partículas e da limpeza do canal onde foi formada a coluna

Tabela 3.11. Protocolo experimental de descarte das partículas e limpeza do canal da coluna.

Descrição	Porta	Volume (µL)	Caudal (mL/min)	Sentido*	Posição
Enchimento da seringa	5	1000	5	a	0
Aspiração de metanol	5	250	2,5	a	1
Envio de metanol sobre a fase sólida	1	200	2	b	1
Aspiração da fase sólida	1	500	5	a	1
Descarte da fase sólida	7	1350	5	b	1
Limpeza do canal da coluna	1	200	2	b	1

* a-aspirar; b-bombear

Capítulo 4

4 Resultados e discussão

4.1 Preparação de partículas de sílica de forma esférica

O estudo iniciou-se com a preparação de emulsões de acordo com Barbé et al^[38], utilizando soluções sol-gel A (Tabela 3.2) de modo a otimizar a concentração de tensioativo (SPAN 80) e também o volume de óleo a utilizar na preparação das emulsões. Fez-se variar a quantidade de tensioativo por volume de óleo, variando também o óleo utilizado: ciclohexano e hexano. O volume de solução de tensioativo foi variado enquanto o volume de sol-gel foi mantido constante. Estes parâmetros foram variados para analisar a sua influência na forma e tamanho das partículas de sílica.

As emulsões obtidas tinham aspeto límpido mas com ligeira opacidade quando o ciclohexano foi utilizado. As partículas obtidas tinham cor amarela, sendo a coloração mais intensa nas partículas preparadas com menor volume de solução de tensioativo, quer esta fosse de hexano ou ciclohexano.

Com volume crescente de solução de tensioativo foi possível obter emulsões menos densas, que levaram a menor aglomeração de partículas. Macroscopicamente notou-se, assim, uma diminuição de partículas aglomeradas com o aumento de volume de solvente e também com o aumento de concentração de tensioativo.

Analisando as imagens obtidas por microscopia ótica verifica-se que a quase totalidades das partículas obtidas são de forma esférica e diminuem de tamanho tanto com o aumento de volume de fase oleosa como com o aumento de concentração de tensioativo.

Para a razão de volumes W/O de 10 com concentrações de tensioativo 0,050 g/mL (A) e 0,100 g/mL (B), quando usado como óleo o hexano não foram obtidas imagens de microscopia, pois as emulsões não resultaram em partículas, mas sim em aglomerados monolíticos.

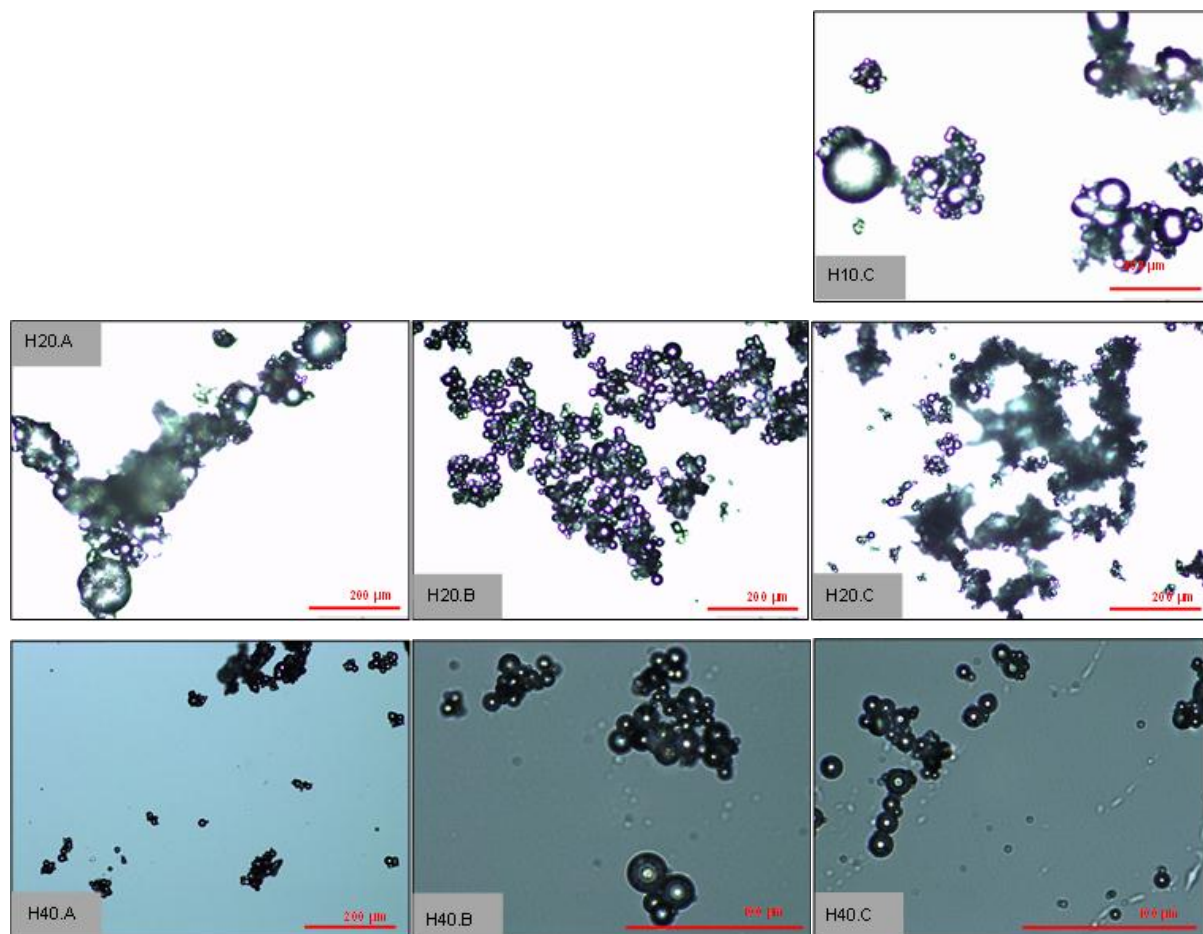


Figura 4.1. Imagens obtidas por microscopia ótica das partículas preparadas usando como solvente o hexano (ampliações de 100 e 400 vezes). Razões de W/O de 10, 20, 40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B (0,100 g/mL) e C (0,200 g/mL).

O mesmo foi observado quando se usou como óleo o ciclohexano, com uma razão W/O de 10 e concentração de tensioativo 0,0500 g/mL (A).

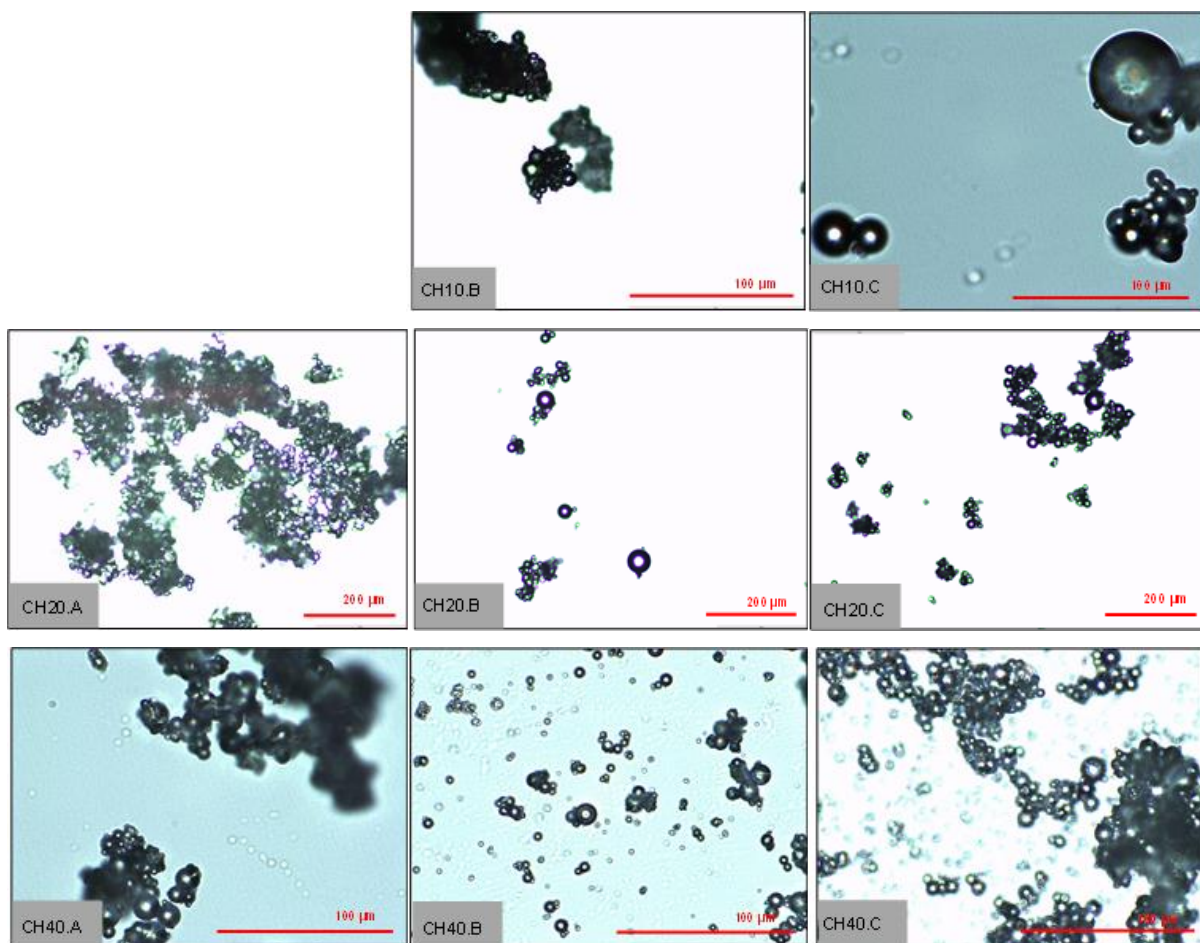


Figura 4.2. Imagens obtidas por microscopia ótica das partículas preparadas usando como solvente o ciclohexano (ampliações de 100 e 400 vezes). Razões de W/O de 10,20,40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B(0,100 g/mL) e C(0,200 g/mL).

Com as imagens obtidas por microscopia ótica e utilizando um programa de captura e medição de imagens de microscopia (Micam Version 1.4, 2009) foi possível obter histogramas de distribuição dos tamanhos de partículas. Na Figura 4.3 observa-se os histogramas obtidos para as partículas obtidas com emulsões em hexano.

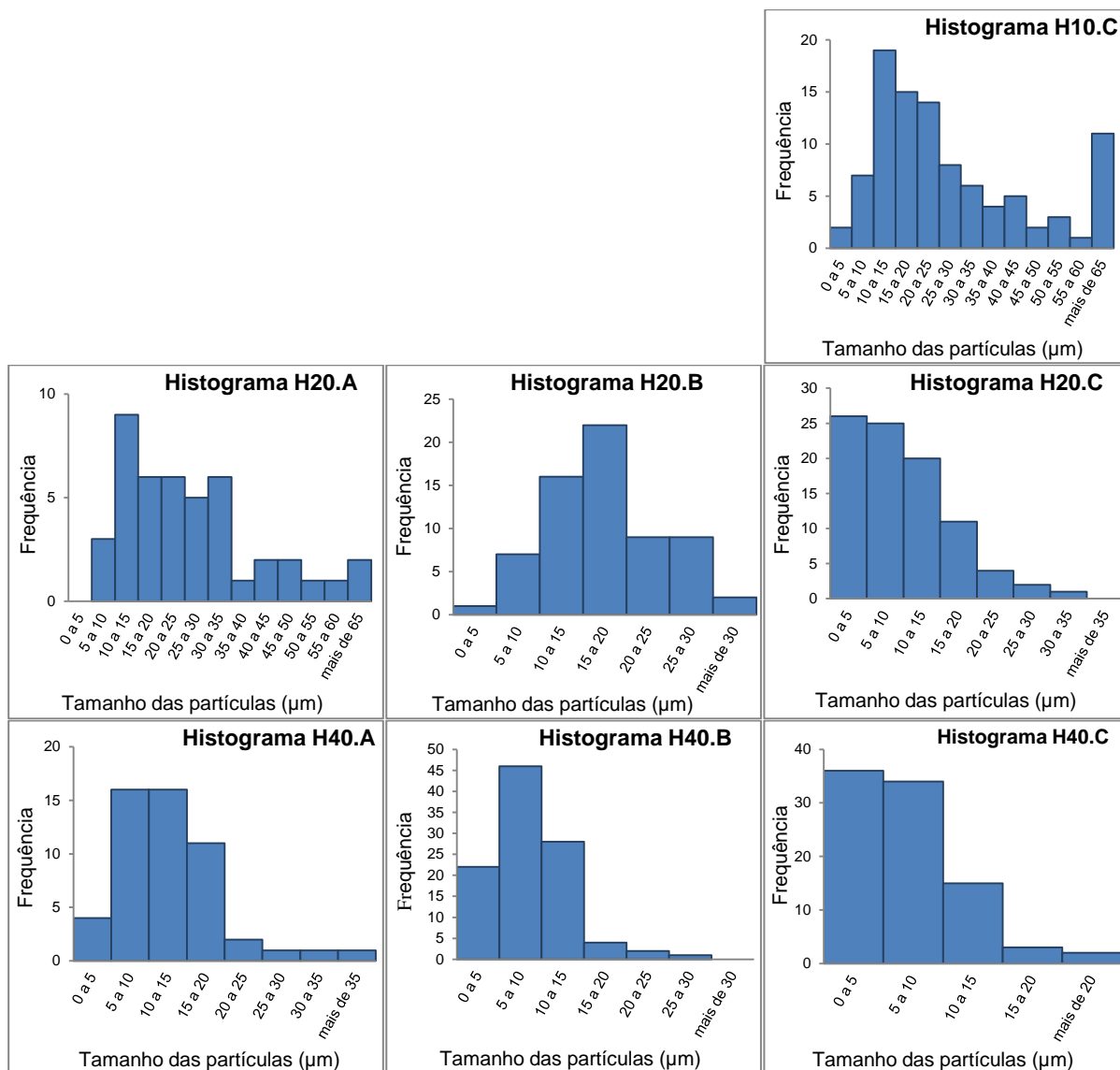


Figura 4.3. Histogramas de distribuição de tamanhos das partículas preparadas usando como solvente o hexano). Razões de W/O de 10,20,40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B (0,100 g/mL) e C (0,200 g/mL).

A Figura 4.4 apresenta os histogramas obtidos para as partículas obtidas com emulsões em ciclohexano.

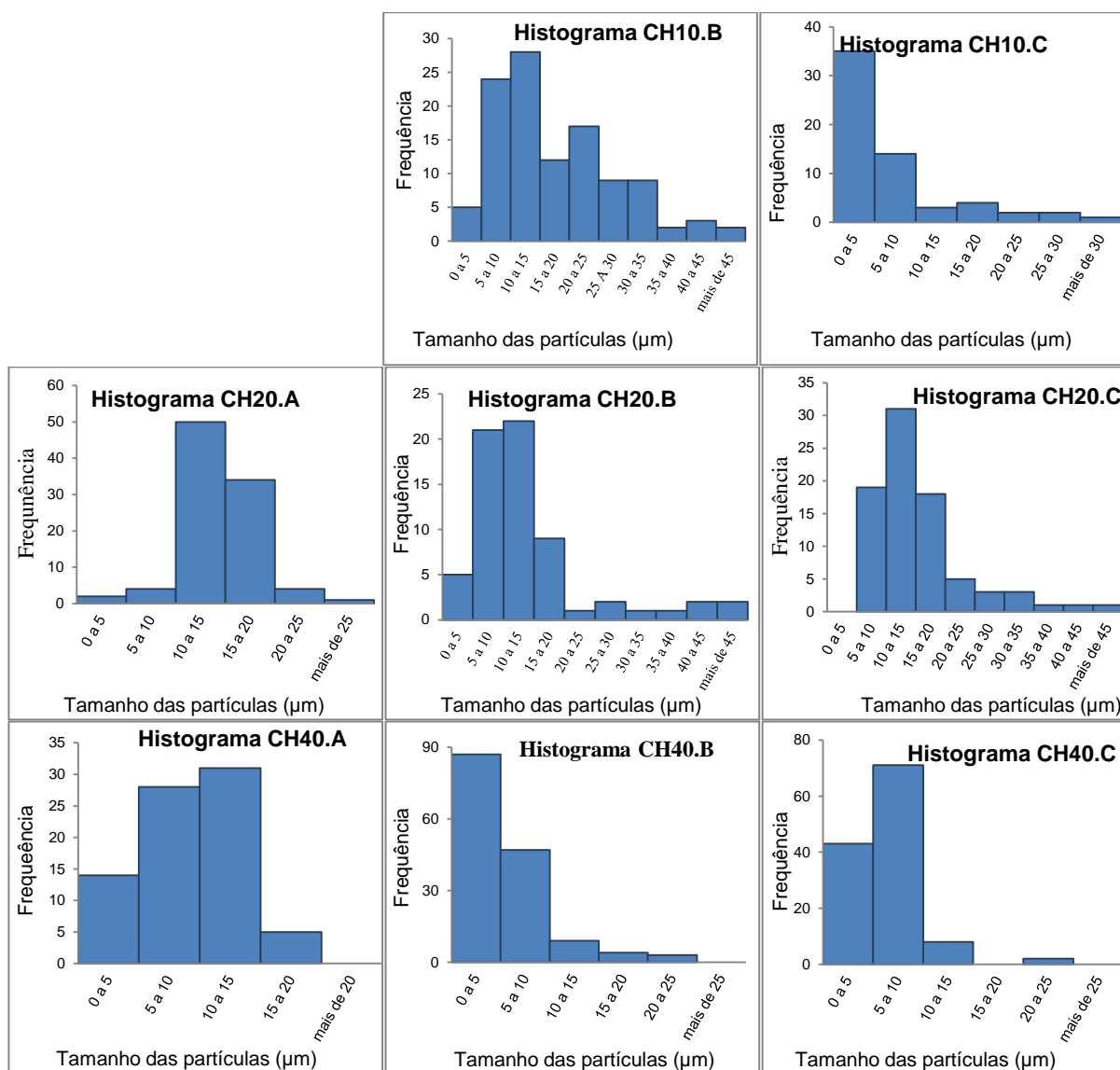


Figura 4.4. Histogramas de distribuição de tamanhos das partículas preparadas usando como solvente o ciclohexano.). Razões de W/O de 10,20,40 e concentrações de tensioativo A (0,050 g/mL), B (0,100 g/mL) e C (0,200 g/mL).

Na análise dos histogramas obtidos, para simplificação, considerou-se por aproximação que os dados tinham uma distribuição gaussiana. Observando os histogramas obtidos houve nitidamente alguns que apresentaram distribuição não gaussiana (exemplo: C20.C, CH10.C...), mas achou-se que para o fim pretendido, uma primeira abordagem ao tamanho médio e dispersão das partículas, esta aproximação era o suficiente.

Foram depois obtidos os tamanhos médios das partículas preparadas e os seus respetivos desvios padrões (Tabela 4.1).

Tabela 4.1. Tamanhos médios das partículas de sílica preparadas.

Ensaio	Hexano (H)		Ciclohexano (CH)	
	Tamanho médio das Partículas (μm)	Desvio Padrão(μm)	Tamanho médio das Partículas (μm)	Desvio Padrão(μm)
10	A
	B	...	18,0	10,7
	C	31,1	7,5	9,4
20	A	28,1	16,6	11,2
	B	18,5	15,5	10,7
	C	9,7	14,4	8,9
40	A	14,8	9,4	4,2
	B	8,7	5,8	4,0
	C	6,7	6,5	3,2

Pela análise dos histogramas e dados de tamanho e desvio padrão das partículas obtidas, notou-se uma diminuição do tamanho de partícula com o aumento de concentração de tensioativo e aumento de volume de fase oleosa.

Observou-se que para a mesma razão de volumes W/O com o aumento da concentração de tensioativo dá-se uma diminuição de tamanho médio das partículas e da dispersão de tamanhos. O tensioativo desempenha funções importantes no controlo da tensão interfacial entre a fase aquosa e a fase orgânica. A adição de tensioativo faz com que a tensão interfacial diminua, havendo um maior controlo sobre os fenómenos de coalescência. No entanto, a diminuição na tensão superficial só acontece até determinada concentração de tensioativo, denominada concentração micelar crítica. A esta concentração dá-se a formação de micelas e a tensão interfacial permanece constante^[38, 74]. Isto leva a crer que as concentrações utilizadas no estudo se encontram abaixo da concentração micelar crítica, uma vez que o aumento de concentração levou sempre à diminuição do tamanho de partículas.

Mantendo uma concentração de tensioativo constante, ao aumentar a razão de volumes W/O observou-se, aqui também, uma diminuição do tamanho médio e da dispersão dos tamanhos de partícula. Com o aumento de volume da fase oleosa há uma maior dispersão das gotículas sol-gel no interior das emulsões, diminuindo os fenómenos de coalescência e agregação de partículas, evitando o crescimento de partícula.

A diminuição de tamanho médio e dispersão de partícula aconteceu independentemente do tipo de óleo utilizado. No entanto as partículas obtidas com a utilização ciclohexano são de menores tamanhos relativamente as partículas preparadas com hexano. Estes resultados vão de encontro aos resultados obtidos por Barbé et al^[38]. Tal

como esperado, o tamanho de partícula diminui com a utilização do solvente de cadeia cíclica no lugar do alcano linear.

4.2 Caracterização dos materiais de impressão molecular

Com os resultados obtidos por microscopia ótica das partículas de sílica escolheu-se a emulsão CH40.A (óleo ciclohexano, razão de volumes 40 e concentração de tensioativo de 0,050 g/mL) para a preparação das partículas de sílicas de impressão. Foram escolhidos estes parâmetros pois permitiam a preparação de partículas com o tamanho médio de partícula maior dentro dos resultados, onde se observou menor dispersão de tamanho.

Na Tabela 4.2 apresenta-se um resumo dos parâmetros de síntese e lavagem das partículas de sílica de impressão preparadas.

O rendimento teórico do processo de obtenção de partículas foi calculado considerando que toda a quantidade dos reagentes iria ser convertida em gel. A massa prática foi obtida por pesagem das materiais de impressão molecular após lavagem por extração em soxhlet.

Os rendimentos obtidos para as partículas de impressão esféricas variaram entre os 60% a 70%. Estes rendimentos foram afetados por perdas no processo de filtração e lavagem em vácuo e lavagem em soxhlet.

No caso das partículas de forma irregular, os rendimentos variaram entre 42% a 45%, sendo como esperado, menores que os obtidos para partículas de forma esférica. Os rendimentos destas partículas para além de afetados pelo processo filtração e lavagem em vácuo e lavagem em soxhlet, foram ainda afetados por perdas ocorridas durante a moagem e peneiração. Só foram consideradas para o cálculo de rendimento as partículas de tamanhos inferiores a 45 μm .

Os tempos de gelificação das soluções sol-gel foram por regra geral bastante demorados, variaram entre as 70 h e as 160 h. Os tempos de lavagem por extração em soxhlet, foram também bastante longos, sendo em média de 32 h.

As partículas obtidas tinham uma coloração relativamente amarela que variou de intensidade para as diferentes soluções sol-gel, exceto na solução sol-gel preparada sem monómero funcional que foi de cor branca. O monómero funcional, um líquido iónico de cor amarela intensa é o responsável pela coloração das partículas de impressão molecular obtidas.

Tabela 4.2. Parâmetros de síntese e lavagem das partículas de sílica preparadas.

Partículas		Rendimento % (η)	Tempo de agitação	Tempo de lavagem	Aspeto após lavagem
A					
(Solução sol-gel original)	MIP	70,7	92h 30min	30h	Amarelo (claro)
B					
(Uso de tampão Acetato)	MIP	59,0	70h 30min	32h	Bege claro
	NIP	48,4			
C					
(Uso de tampão Acetato)	MIP	55,4	113h 30min	32h	Bege claro
D					
(Solução sol-gel A menor razão de solvente)	MIP	71,3	70h 30min	33h	Bege claro
	NIP	63,8			
E					
(Solução sol-gel A maior razão de solvente)	MIP	60,9	160h	33h	Bege claro
	NIP	64,4			
F					
(Solução sol-gel E. LI mais recente)	MIP	64,4	160h	33h	Bege claro
	NIP	67,9			
G					
(Solução sol-gel E. Partículas irregulares)	MIP	41,9	Até solidificar	32h	Amarelo (intenso)
	NIP	44,5			
H					
(Solução sol-gel A sem monómero funcional)	MIP	16h 30min	32h	Branco

4.3 Caracterização morfológica das partículas em estudo

Foram caracterizadas morfológicamente partículas de impressão molecular preparadas durante o estudo, partículas de impressão molecular preparadas por outro membro do grupo de investigação e ainda partículas comerciais.

4.3.1 Partículas de impressão molecular preparadas

MIP A

Começou-se por preparar partículas de solução sol-gel MIP/NIP A. As partículas MIP A foram obtidas com sucesso. Observando a Figura 4.5 obtida por microscopia nota-se um elevado número de partículas esféricas com tamanho médio de 10,9 μm com um desvio padrão de 5,1 μm .

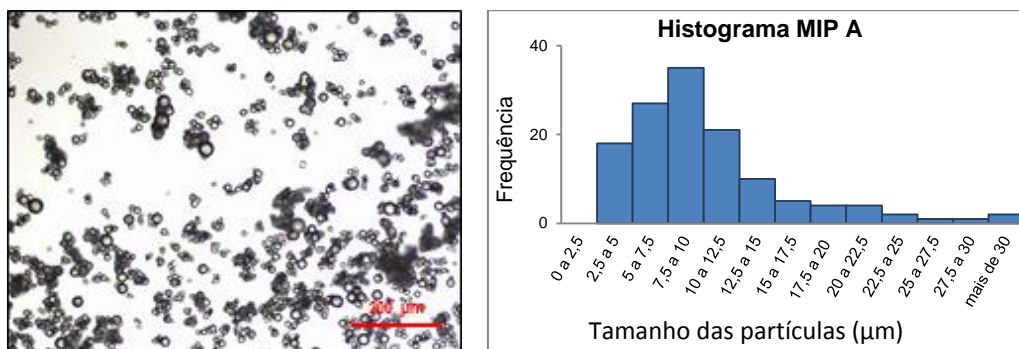


Figura 4.5. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP A (ampliação 100x).

Verificou-se que as partículas MIP A tinham partículas de tamanhos demasiado reduzidos para utilização em LOV, aumentando muito a pressão nos canais de transporte levando a perda de líquidos pelas portas adjacentes ao canal da coluna extratora. Este aumento de pressão era devido a colmatagem do “frit” usado na coluna extratora, pelas partículas de menores dimensões. Foi necessário efetuar a sedimentação das partículas MIP A de modo a eliminar as partículas de menores tamanhos.

Antes do processo de sedimentação tentou-se a separação dos aglomerados de partículas que se observam macroscopicamente, usando para isso o banho de ultrasons. Verificou-se por microscopia ótica que num tempo até 2 minutos o banho de ultrasons não danificava, de forma visível por esta técnica as partículas MIP A (Figura 4.6).

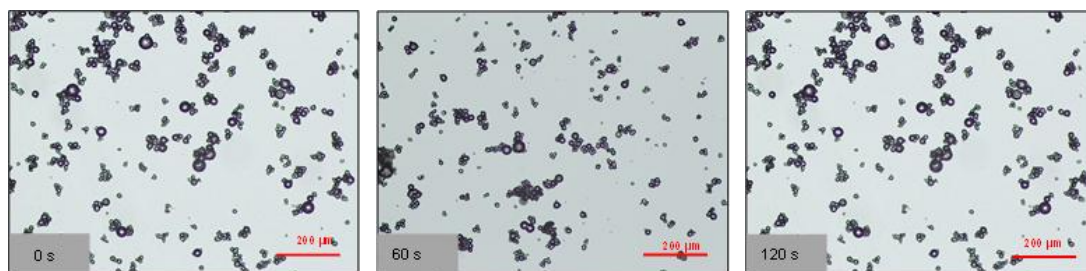


Figura 4.6. Imagens de microscópio ótico das partículas MIP A em MEOH após 0s, 60s e 120s de banho de ultrasons (ampliação 100x).

Do processo de sedimentação resultou uma nova distribuição de partículas (Figura 4.7), obtiveram-se partículas de tamanho médio 15,1 μm e desvio padrão 4,9 μm . No histograma observa-se uma clara diminuição do número de partículas com tamanhos entre os 5 μm e 7,5 μm .

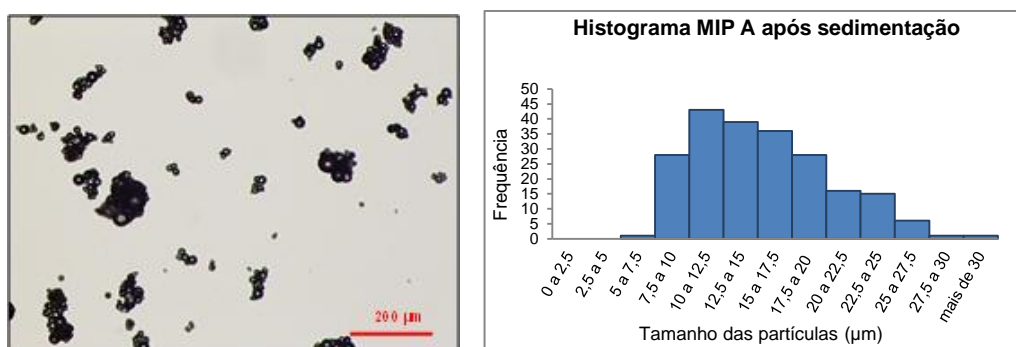


Figura 4.7. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP A após o processo de sedimentação (ampliação 100x).

Não se conseguiram obter partículas NIP A. As várias soluções sol-gel preparadas ficaram sempre baças.

Medindo o pH das soluções sol-gel MIP A / NIP A verificou-se que estas tinham pH diferentes. A solução sol-gel MIP apresentava um pH de 5, enquanto a solução sol-gel NIP um pH de 6. A diferença de pH está associada à molécula molde (naproxeno, pK_a 4,2 a 25°C) que contém grupos ácidos diminuindo o pH da solução MIP.

MIP/NIP B

Como forma de garantir o controlo do pH prepararam-se partículas de solução sol-gel B usando como catalisador uma solução tampão acetato (pH=5). O controlo do pH da solução no valor 5 permite que a molécula de naproxeno se encontre predominantemente na sua forma básica (desprotonada).

Analisando as imagens obtidas por microscopia ótica para as partículas MIP/ NIP B (Figura 4.8) observou-se que o uso do tampão acetato nas soluções sol-gel alterou as características morfológicas das partículas. Obtiveram-se com estas soluções partículas MIP esféricas de tamanho médio 23,7 μm e desvio padrão de 13,5 μm , no entanto obtiveram-se

um grande número de partículas de forma irregular. Notou-se ainda que estas partículas eram bastante frágeis, quebravam facilmente. Pode ser esta a origem de algumas das partículas irregulares e não o processo de polimerização em emulsão.

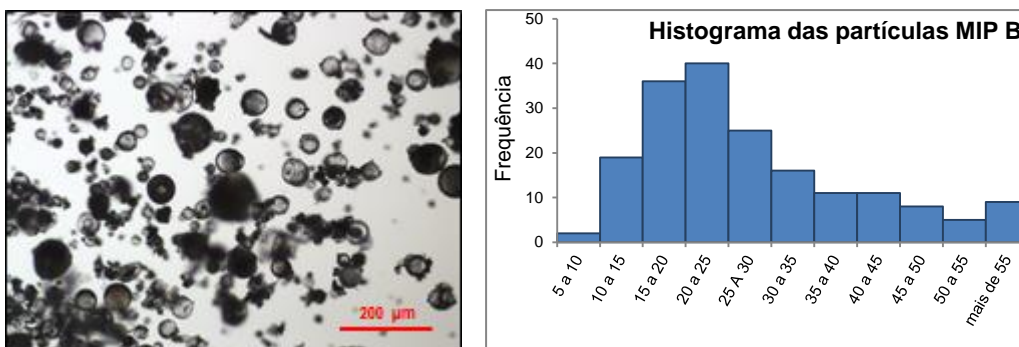


Figura 4.8. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP B (ampliação 100x).

Conseguiram-se obter partículas NIP usando esta solução sol-gel. As partículas NIP B (Figura 4.9) obtidas tinham um tamanho médio de 13,7 μm e um desvio padrão de 8,9 μm. Tal como nas partículas MIP B observaram-se partículas irregulares mas em muito menor número. Foi possível também observar o que aparentavam serem gotículas/partículas de muito baixas dimensões na superfície das partículas de maiores dimensões.

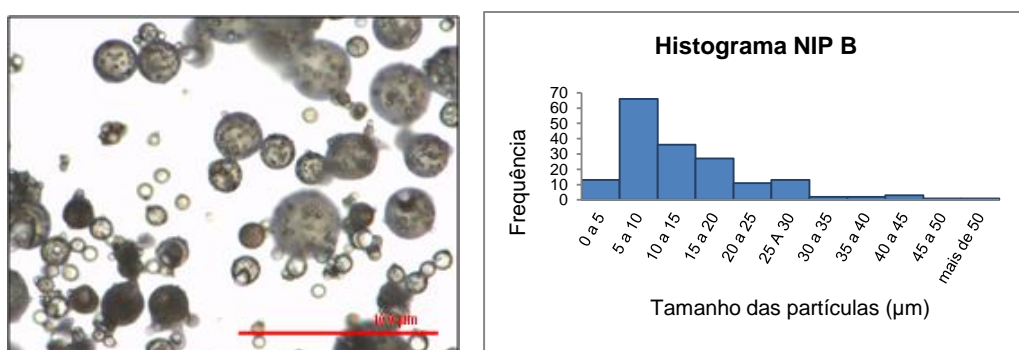


Figura 4.9. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP B (ampliação 400x).

MIP C

Preparou-se ainda um MIP C que diferia do MIP B apenas no tempo de gelificação da solução sol-gel. A solução sol-gel do MIP C foi deixada durante mais 21 h em agitação, como forma de garantir que o processo de envelhecimento, formação das ligações do processo sol-gel se desse na maior extensão possível. As características morfológicas (continuam a observar-se um elevado número de partículas irregulares), assim como o rendimento da reação (59,0% no caso do MIP B e 55,4 % no caso do MIP C) não mostraram que este parâmetro tenha resultado em melhorias do MIP C relativamente ao MIP B a estes níveis. Ou seja, aparentemente o aumento de 23% de tempo de reação, indo no sentido de maior maturação dos agregados sol-gel, não implicou uma melhoria observável na morfologia das partículas.

As partículas MIP C (Figura 4.10) obtidas tinham um tamanho médio de 23,6 μm e um desvio padrão de 16,4 μm .

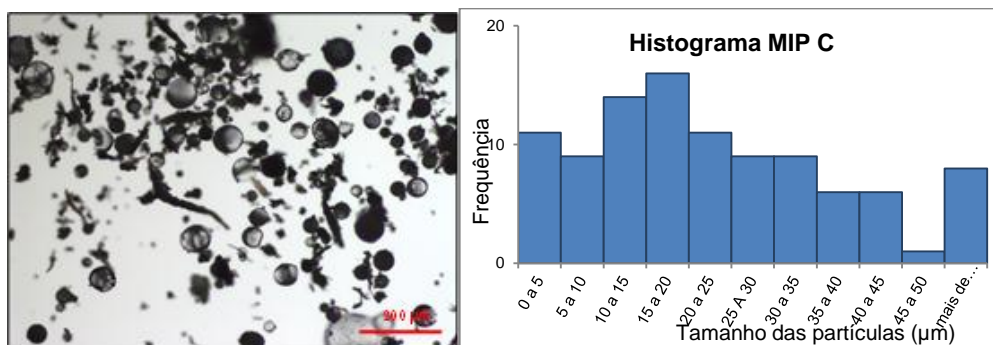


Figura 4.10. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP C (ampliação 100x).

MIP/NIP D

A utilização de tampão acetato nas soluções sol-gel B teve implicações negativas nas características morfológicas e no desempenho das partículas como será observado mais adiante. Na solução sol-gel E voltou-se a utilizar uma solução aquosa de NaOH, diminuindo apenas a quantidade de metanol adicionado quando comparado com a solução sol-gel A. Com uma razão de solvente menor esperava-se que o tempo de agitação necessário fosse menor. Esta alteração diminuiu o tempo de agitação em 22 h e foi possível a preparação de partículas NIP.

Relativamente ao tamanho médio das partículas MIP D (Figura 4.11) esta alteração não mostrou grande influência. O tamanho médio das partículas foi de 12,1 μm com um desvio 7,5 μm valores bastante próximos aos obtidos nas partículas MIP A.

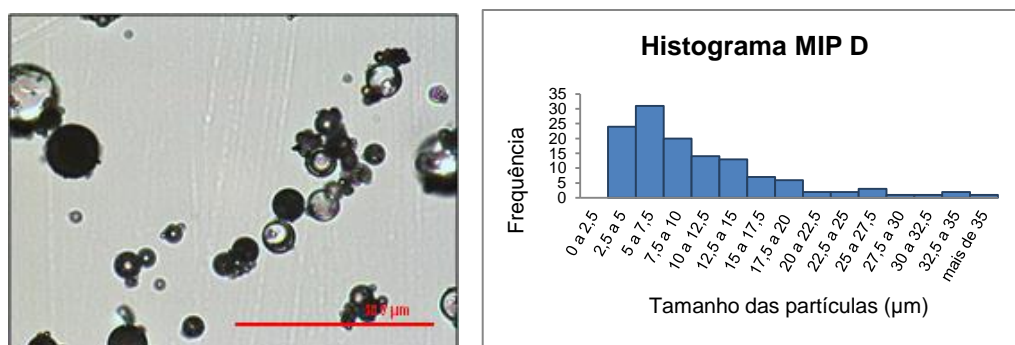


Figura 4.11. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP D (ampliação 400x).

A alteração na quantidade de MeOH permitiu a obtenção de partículas NIP. As partículas NIP D (Figura 4.12) obtidas tinham um tamanho médio de 21,0 μm e um desvio padrão de 19,9 μm . As partículas NIP D são visivelmente maiores e com uma maior dispersão de tamanhos do que as partículas MIP D. Isto pode dever-se ao facto de as soluções sol-gel MIP e NIP não estarem nas mesmas condições de pH. A nível de desempenho, como será visto mais adiante, esta alteração teve implicações negativas.

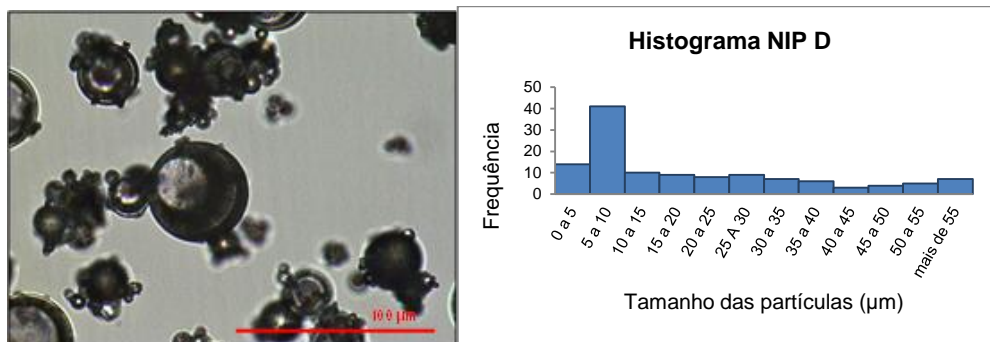


Figura 4.12. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP D (ampliação 400x).

MIP E/MIP F

As partículas MIP E e MIP F foram preparadas utilizando um razão de metanol superior ao MIP A. Diferem entre si, apenas no uso de uma solução de líquido iónico de preparação mais recente no caso do MIP F.

As partículas MIP E (Figura 4.13) e MIP F (Figura 4.14) tiveram tamanhos médios de partícula e valores de desvio padrão muito similares 16,6 μm; 12,5 μm e 15,6 μm; 12,3 μm respetivamente.

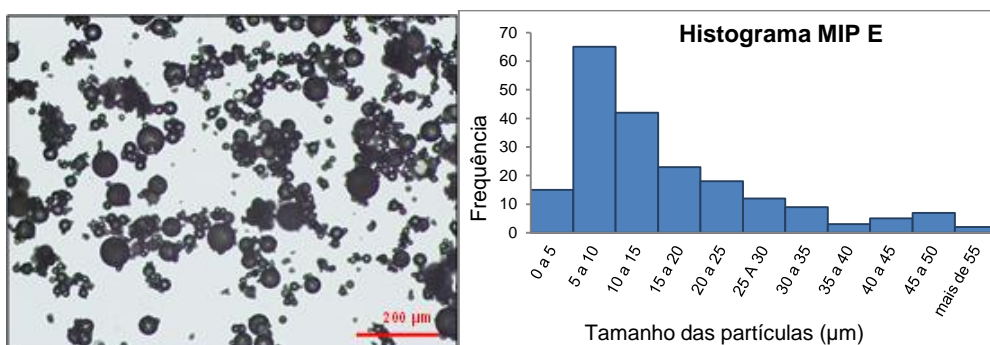


Figura 4.13. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP E (ampliação 100x).

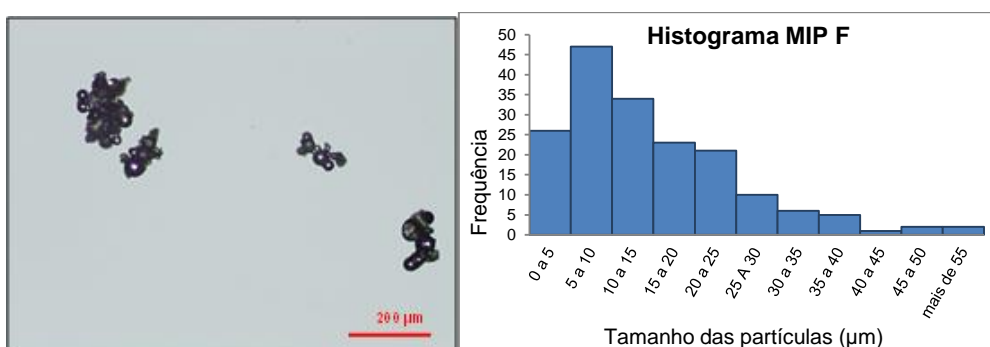


Figura 4.14. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas MIP F (ampliação 100x).

NIP E/NIP F

No caso das partículas NIP E (Figura 4.15) e NIP F (Figura 4.16) observou-se igualmente tamanhos médios de partícula e valores de desvio padrão similares, 12,1 μm ; 9,7 μm e 11,9 μm ; 9,8 μm respetivamente.

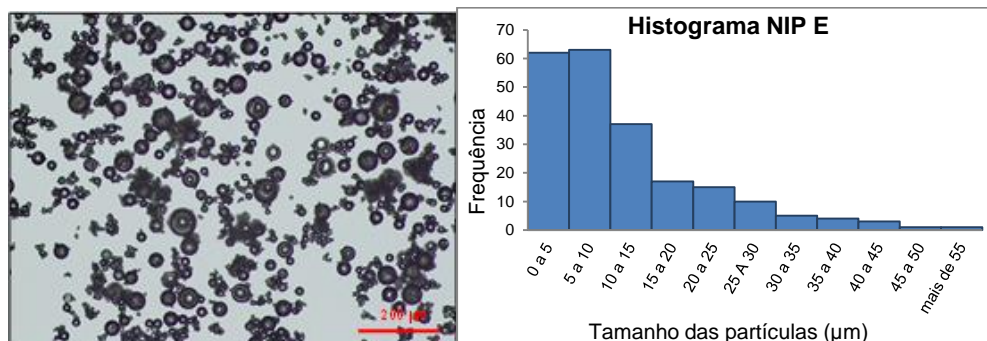


Figura 4.15. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP E (ampliação 100x).

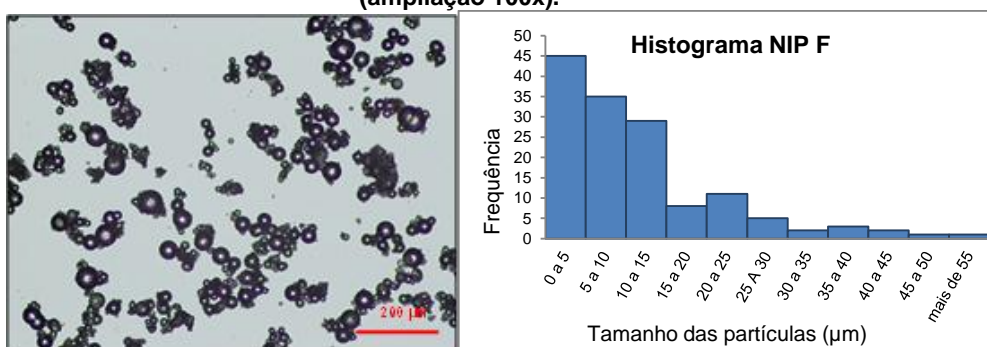


Figura 4.16. Imagem de microscópio ótico e histograma de distribuição de tamanho das partículas NIP F (ampliação 100x).

MIP/NIP G

As partículas MIP/NIP G (Figura 4.17) foram preparadas utilizando uma solução sol-gel semelhante à solução sol-gel H. Foram preparadas em monólito e posteriormente moídas e peneiradas, tendo sido obtidas em formato irregular com tamanhos inferiores a 45 μm .

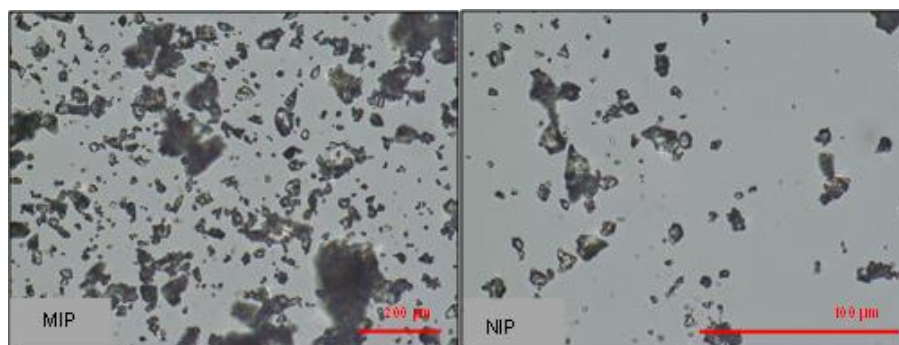


Figura 4.17. Imagens de microscópio ótico MIP/NIP G (ampliação 100 vezes no MIP e ampliação 400 vezes no NIP).

MIP H

Preparou-se ainda um material de impressão molecular com solução sol-gel MIP A, mas sem o monómero funcional para utilização na caracterização química dos polímeros de impressão sintetizados, MIP H (Figura 4.18). Este polímero tinha uma cor branca podendo com isso concluir-se que o tom amarelo das restantes partículas em que o monómero funcional tinha sido adicionado na solução sol-gel é responsável pela coloração.

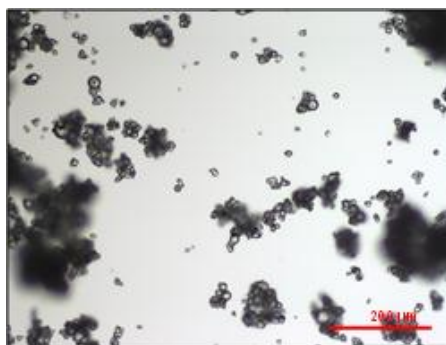


Figura 4.18. Imagem de microscópio ótico das partículas MIP H (ampliação 100 vezes).

A seguir apresenta-se a Tabela 4.3 com um resumo dos tamanhos médios e desvios padrão das partículas esféricas de impressão de sílica obtidas das diferentes soluções sol-gel

Tabela 4.3. Resumo das características das partículas de sílica de impressão preparadas

Partículas	Forma das partículas	Tamanho médio das Partículas (µm)	Desvio Padrão (µm)
MIP A	Esférica	10,9	5,1
MIPA após sedimentação	Esférica	15,1	4,9
MIP B	Esférica/Irregulares	23,7	13,5
NIP B	Esférica/Irregulares	13,7	8,9
MIP C	Esférica/Irregulares	23,6	16,4
MIP D	Esférica	12,1	7,6
NIP D	Esférica	21,0	19,9
MIP E	Esférica	16,6	12,5
NIP E	Esférica	12,1	9,7
MIP F	Esférica	15,5	12,3
NIP F	Esférica	11,9	9,8
MIP G	Irregular	≤45	≤45
NIP G	Irregular	≤45	≤45
MIP H	Esférica

4.3.2 Outras partículas usadas no estudo

MIP 525

Foram estudadas partículas MIP 525 (Figura 4.19) também estas de formato irregular, mas a molécula molde foi adicionada à solução sol-gel na forma de sal de sódio.

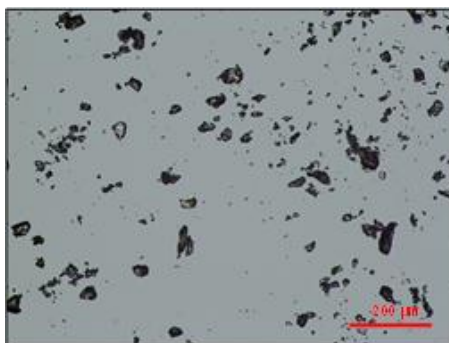


Figura 4.19. Imagem de microscópio ótico das partículas MIP 525 (ampliação 100 vezes).

MIP/NIP 762

Foram estudadas as partículas MIP 762 E NIP 762 (Figura 4.20) de formato irregular com tamanhos inferiores a 45 µm. Estas partículas foram preparadas por polimerização em monólito, utilizando soluções sol-gel com razões iguais às partículas MIP/NIP H. Este material de impressão molecular já tinha sido preparado há mais de 1 ano.

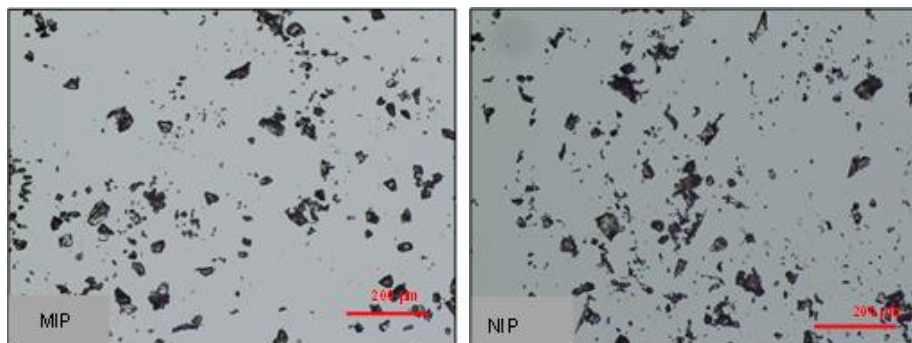


Figura 4.20. Imagens de microscópio ótico MIP/NIP 762 (ampliação 100x).

MIP PF

Foram ainda estudadas partículas de impressão molecular preparadas por “*pore filling*”. Estas partículas de impressão são preparadas por excerto de uma solução sol-gel em partículas porosas de sílica de suporte. Estas partículas tinham tamanhos entre os 20 µm e os 70 µm.

SupelMIP™ NSAIDs

Estudaram-se também partículas de impressão molecular comerciais MIP NSAIDs, que são polímeros usados para extração de anti-inflamatórios não esteróides. Já testados para extração de naproxeno, ácido clofíbrico, diclofenac e ibuprofeno, devendo ser usado

em condições ácidas e com amostras aquosas Estas partículas tinham um tamanho médio de 45 μm , mas observa-se pela Figura 4.21 uma dispersão considerável de tamanhos^[75].

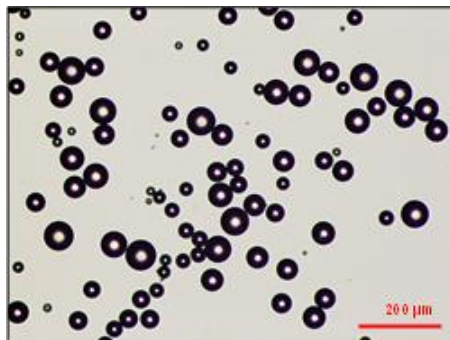


Figura 4.21. Imagem de microscópio ótico das partículas MIP NSAIDs (ampliação 100x).

Partículas OASIS™ HLB

As partículas OASIS™ HLB são um polímero macroporoso produzido a partir de um balanço entre monómeros lipofílicos de divinilbenzeno e monómeros hidrofílicos de N-vinilpirrolidona, permitindo assim, a extração de compostos ácidos, básico e neutros em toda a gama de pH. Têm tamanhos médios de 30 μm ^[76].

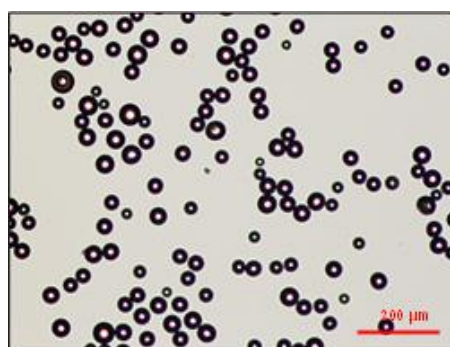


Figura 4.22. Imagem de microscópio ótico das partículas OASIS™ HLB (ampliação 100x).

A seguir apresenta-se a Tabela 4.4 com um resumo das características morfológicas de outras partículas usadas durante o estudo.

Tabela 4.4. Resumo das características de outras partículas usadas durante o estudo.

Partículas	Forma das partículas	Tamanho médio das Partículas (μm)
MIP 525	Irregular	≤ 45
MIP 762	Irregular	≤ 45
NIP 762	Irregular	≤ 45
MIP PF	Esférica	45
MIP NSAIDs	Esférica	45
OASIS™ HLB	Esférica	30

4.4 Caracterização química dos materiais de impressão molecular

Para a caracterização química dos polímeros sintetizados começou por fazer-se espectros de FTIR da molécula molde e do monómero funcional.

No espectros de FTIR da molécula molde (Figura 4.23) foi possível identificar no número de onda 1730 cm^{-1} e aos 1236 cm^{-1} as bandas características dos ácidos carboxílicos das ligações C=O e C-O respetivamente, aos 1129 cm^{-1} a banda característica do grupo éter (ligação C-O). No intervalo 2970 cm^{-1} aos 3036 cm^{-1} identificou-se bandas fracas características do grupo aromático da molécula molde.

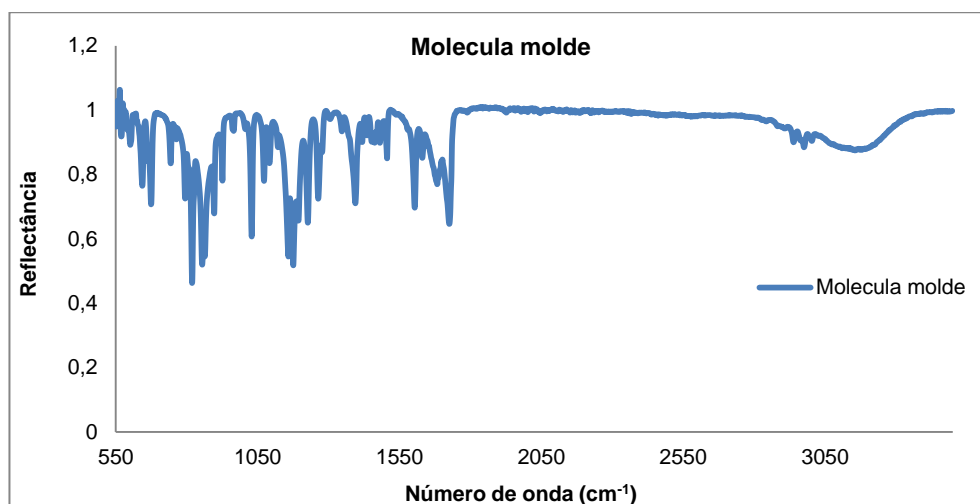


Figura 4.23. Espectro FTIR de reflectância da molécula molde.

No espectro de FTIR do líquido iónico (Figura 4.24) identificou-se ao número de onda 1660 cm^{-1} a banda característica do grupo imidazólio e aos 1090 cm^{-1} a banda característica do estiramento Si – O – Si.

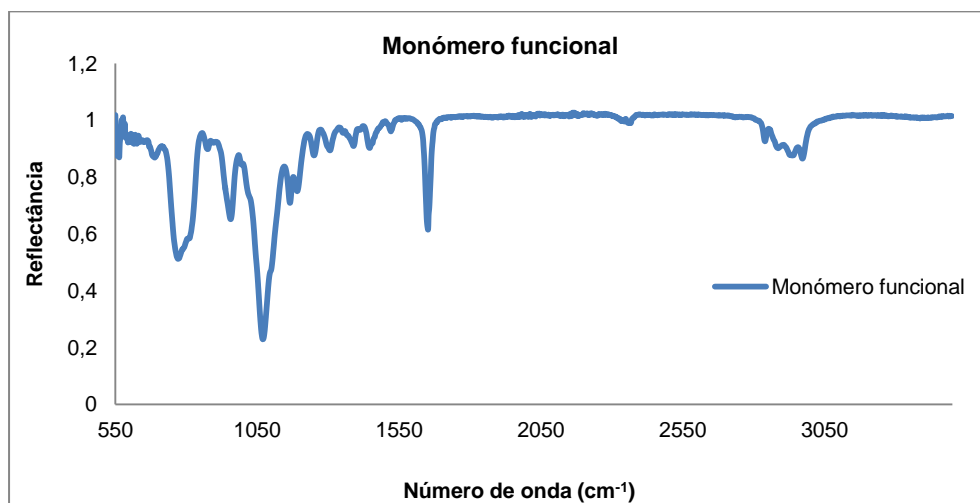


Figura 4.24. Espectro FTIR de reflectância do monómero funcional.

Sobrepondo o espectro do monómero funcional, com os espectros das partículas MIP A e MIP H (Figura 4.25) conseguimos observar que a banda característica do grupo imidazólio está presente no polímero MIP A, e tal como esperado não está presente no MIP H. Pode-se concluir que esta banda indica a incorporação do grupo imidazólio na rede polimérica dos polímeros de impressão preparados.

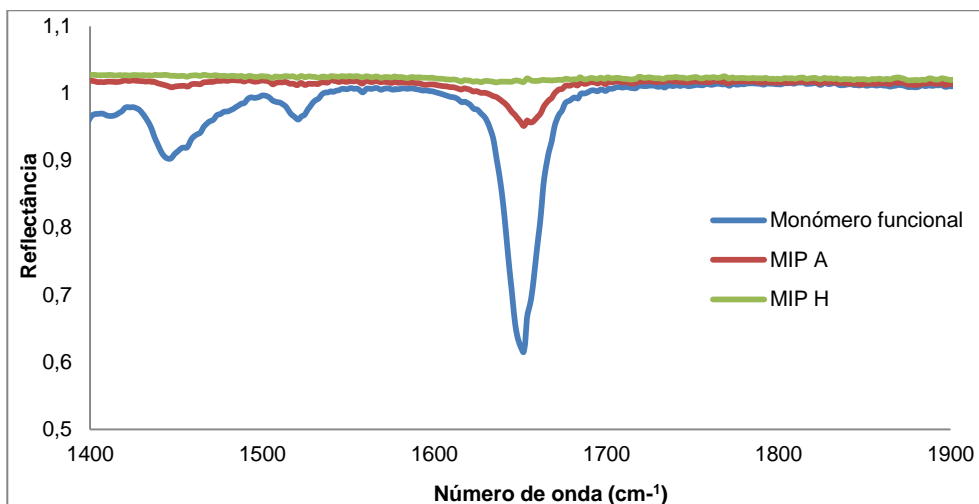


Figura 4.25. Espectro FTIR de reflectância do monómero funcional, MIP A e MIP H.

A banda característica do grupo imidazólio foi observada em todos os polímeros sintetizados com monómero funcional com intensidades similares tanto para polímeros MIP e NIP.

Na Figura 4.26 observa-se o espectro MIP/NIP D como exemplo as bandas características das partículas de impressão preparadas. No espectros dos polímeros identificou-se a banda característica do grupo imidazólio aos 1660 cm⁻¹ e a banda característica do estiramento Si – O – Si aos 1090 cm⁻¹.

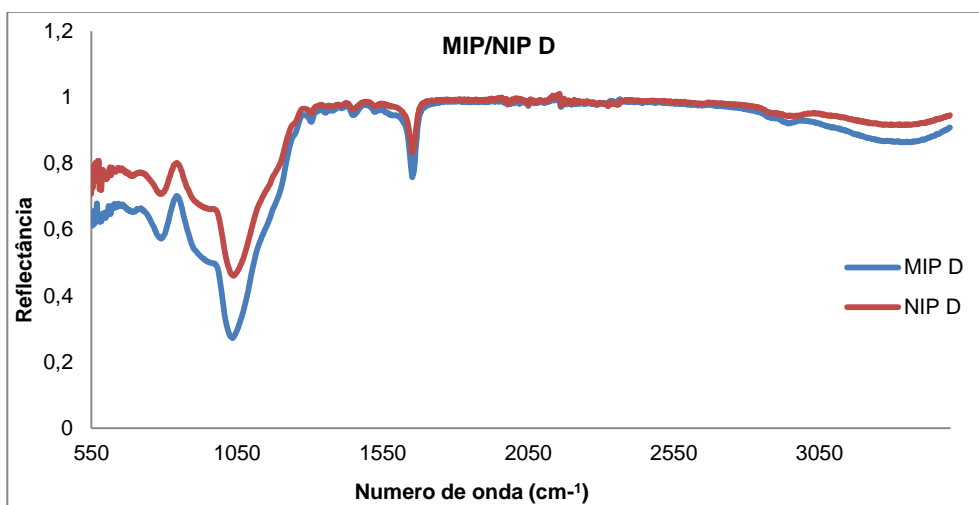


Figura 4.26. Espectro FTIR de reflectância das partículas de sílica de impressão MIP/NIP D.

Notou-se que com a utilização, a intensidade da cor das partículas MIP/NIP de impressão molecular preparadas diminuía, o tom amarelo destas partículas tornava-se mais ténue. Com sobreposição dos espectros de FTIR das partículas MIP/NIP, antes e depois de utilização SPE, observou-se que a banda característica do grupo imidazólio se mantinha, no entanto surgiam duas bandas adjacente a esta. Isto sugere uma alteração na composição química dos polímeros, esta alteração surgiu em todos os polímeros preparados. Na Figura 4.27 observam-se o surgimento das bandas nas partículas MIP/NIP D como exemplo.

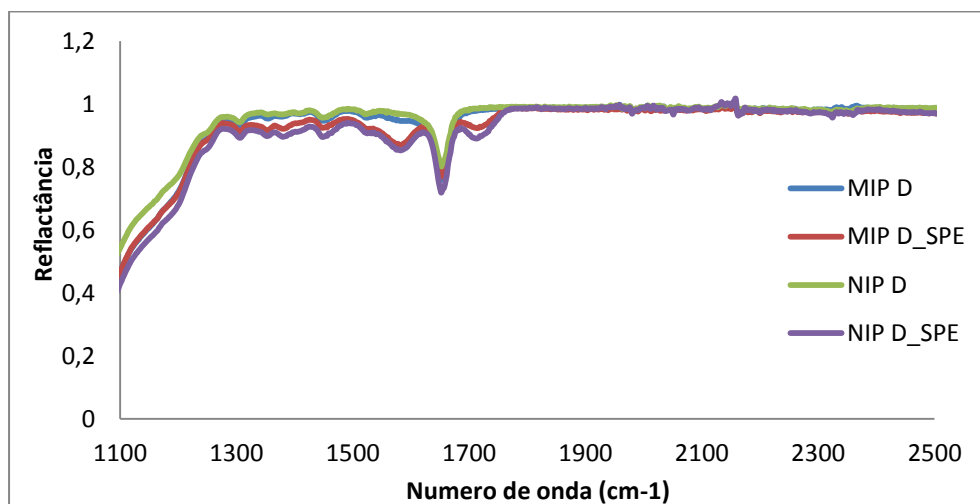


Figura 4.27. Espectro FTIR de reflectância das partículas de sílica de impressão MIP/NIP D antes e após utilização em SPE.

4.5 Avaliação do efeito de impressão molecular por extração em fase sólida

4.5.1 Partículas de impressão molecular preparadas

Neste estudo, aplicou-se as partículas sintetizadas à técnica de extração em fase sólida para estudo preliminar de eficiência de impressão.

As moléculas em estudos, fármaco anti-inflamatórios não esteróides, são compostos pouco polares com características químicas muito semelhantes. Os fármacos foram adicionadas aos cartuchos SPE inicialmente com carga metanólica.

Com vista à aplicação das partículas que demonstraram resultados positivos de seletividade na técnica LOV e futura aplicação em amostras reais, foram também estudadas as alterações que se davam na retenção das partículas quando estas eram adicionadas em solução aquosa.

Começou-se por testar as partículas MIP A, como não foi possível a preparação do respetivo NIP comparou-se a eluição da molécula molde naproxeno (NAP) com uma molécula análoga, o ibuprofeno (IBU).

As partículas MIP A (Figura 4.28) demonstraram seletividade à molécula molde relativamente a uma molécula análoga. A solução carga testada inicialmente, consistia numa solução metanólica com uma mistura de 3ppm de naproxeno e ibuprofeno. Observou-se a quase total retenção da molécula molde 98,5%, enquanto só 64,3% da molécula de IBU ficou retida na passagem da solução carga. Foi necessário um eluente com maior força de eluição (10% HCOOH em MeOH) e 4 alíquotas de 1 mL para se dar a eluição completa da molécula de NAP, enquanto a molécula de IBU foi eluída na sua maioria com as alíquotas de H₂O e MeOH.

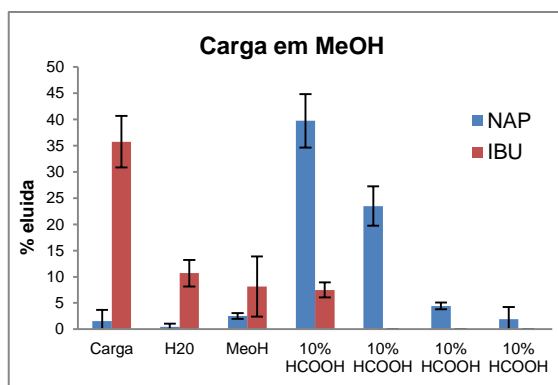


Figura 4.28. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP A, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Este estudo foi repetido 5 meses mais tarde com o mesmo cartucho de SPE e nessa altura verificou-se uma alteração nas propriedades das partículas de impressão molecular. Apesar da molécula de NAP (Figura 4.29) continuar a ficar mais retida no leito adsorvente e ser necessário um eluente de maior força de eluição para a sua extração completa, verificou-se que uma maior quantidade de molécula molde era eluída durante a passagem da solução amostra quando comparada com os primeiros estudos feitos com estas partículas. Aparentemente houve uma deterioração das capacidades de retenção do material da primeira fase do estudo para a segunda. Isto foi de encontro aos resultados obtidos na caracterização química, onde se observou uma alteração da composição química dos polímeros após a sua utilização. Esta deterioração da capacidade de retenção dos materiais pode dever-se a várias razões: ao ácido usado na extração, às condições de armazenamento do cartucho SPE ou ser característica destes geis a deterioração com o próprio tempo.

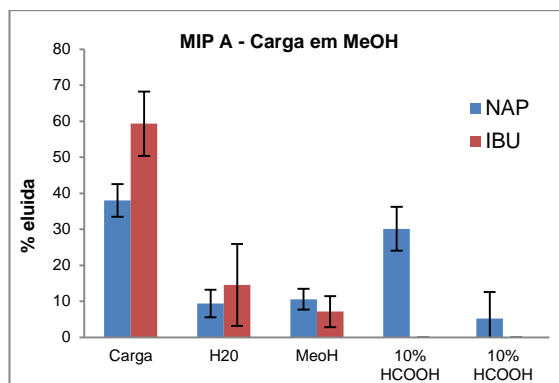


Figura 4.29. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP A, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Como estes materiais apresentaram aparente seletividade à molécula molde e, tendo em vista a aplicação dos materiais à técnica LOV e uma futura aplicação em amostras reais testou-se a adição ao cartucho SPE das moléculas em estudo em solução aquosa (Figura 4.30).

Como seria de esperar, visto que as moléculas em estudo são pouco polares, tendo estas menor tendência a ficar na fase aquosa, ficaram mais retidas no leito adsorvente. As duas moléculas saem em conjunto nas alíquotas de 10% HCOOH, no entanto na alíquota de MeOH saiu apenas 3,6% da molécula molde, sendo eluída principalmente nas alíquotas de 10% HCOOH.

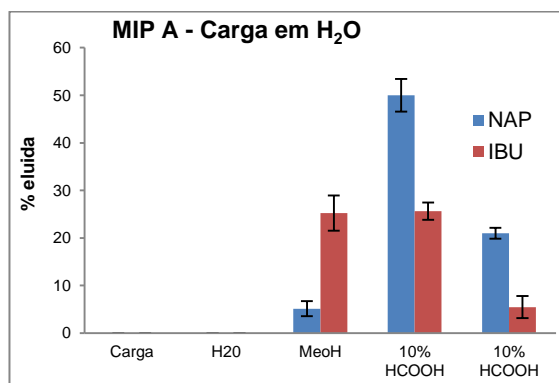


Figura 4.30. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP A, carga em H₂O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Analisando os resultados obtidos por SPE para as partículas MIP/NIP B (Figura 4.31) podemos observar que estas partículas não retêm as moléculas em estudo. Na solução carga os fármacos são eluídos na sua quase totalidade, não existindo diferenciação entre as duas moléculas nem diferenças MIP NIP.

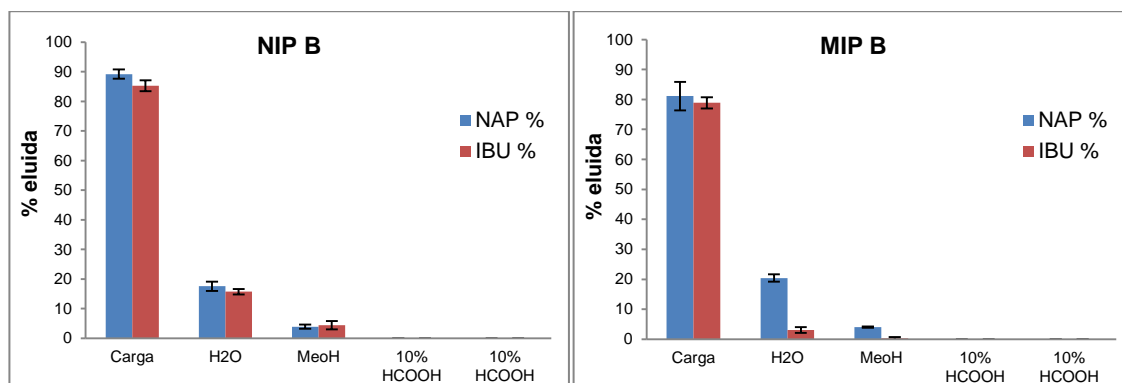


Figura 4.31. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP B, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Tal como esperado após os resultados MIP/NIP B observou-se que as partículas MIP C (Figura 4.32) também não apresentavam retenção das moléculas em estudo, sendo eluídas na sua quase totalidade na alíquota de carga.

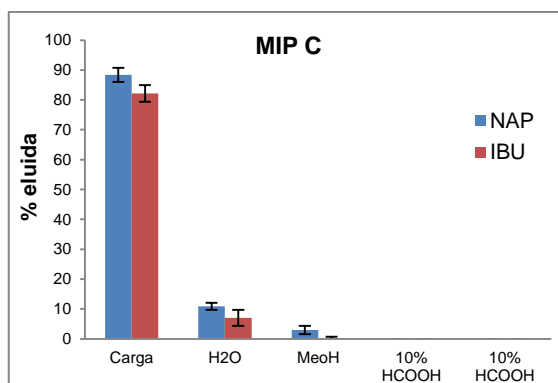


Figura 4.32. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP C, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Analisando os resultados de extração MIP/NIP D (Figura 4.33) observa-se a eluição de 68% de NAP, 83% de IBU no caso do MIP D e de 61% de NAP, 74% de IBU nas partículas NIP durante a alíquota de carga. A eluição da totalidade da molécula de NAP arrasta-se até a terceira adição de alíquota de solvente com mais força de eluição, mas isto acontece quer para partículas MIP como NIP, indicando que esta retenção não é devido a locais de impressão.

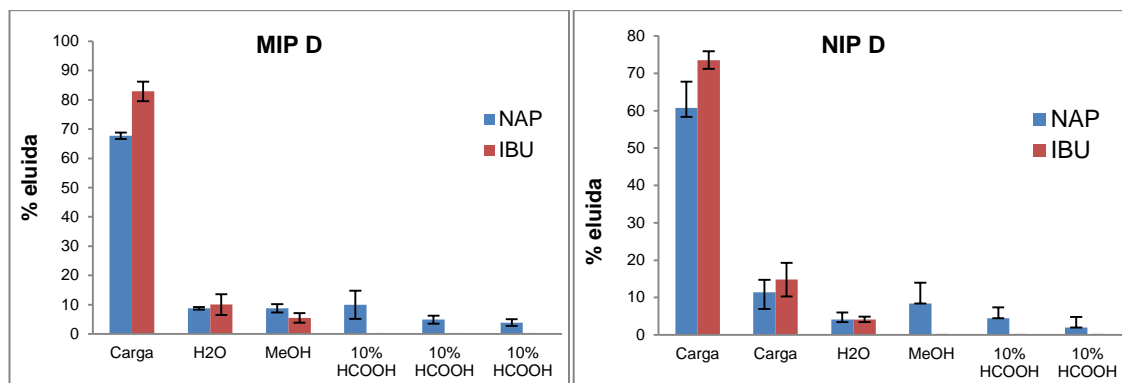


Figura 4.33. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP D, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

O comportamento das partículas MIP/NIP E (Figura 4.34) e MIP/NIP F (Figura 4.35) foi um comportamento muito similar aos demonstrado pelas partículas MIP/NIP D. Tal como, as partículas MIP/NIP E estas partículas também não demonstraram seletividade aos fármacos em estudo, as moléculas foram eluídas em grande extensão durante alíquota de carga.

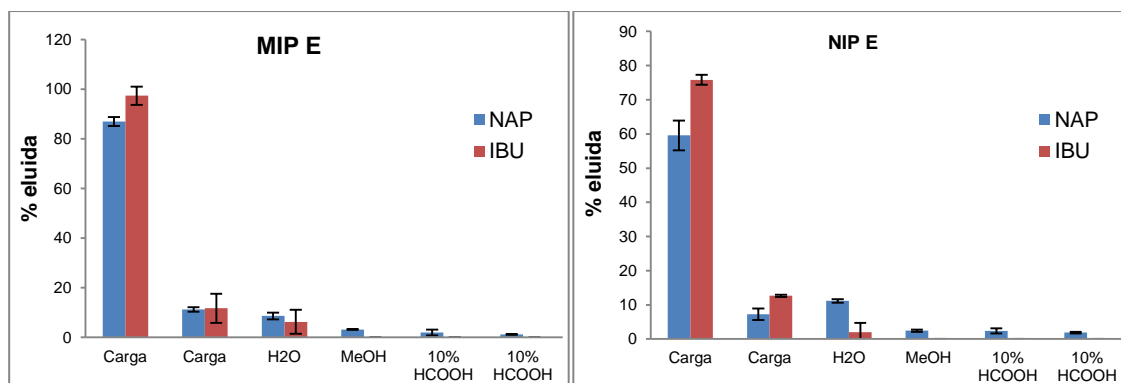


Figura 4.34. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP E, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

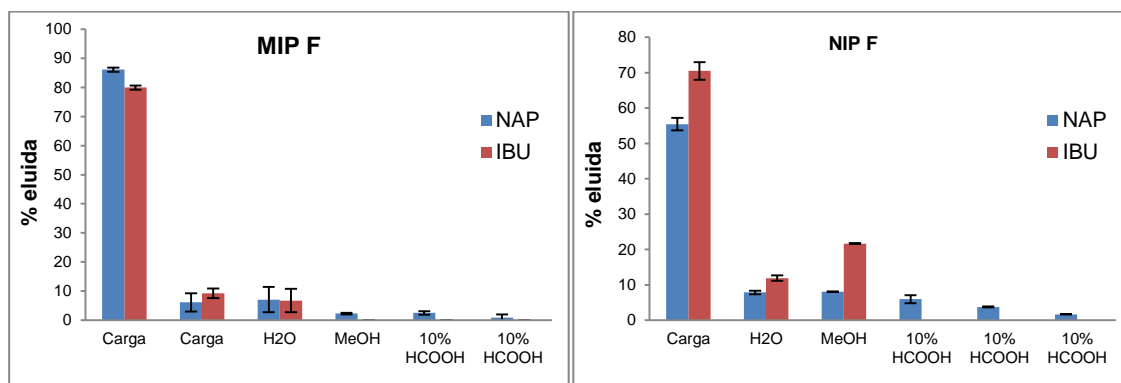


Figura 4.35. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP F, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Nas partículas irregulares MIP/NIP G (Figura 4.36) os resultados demonstraram a eluição quase total dos fármacos durante a alíquota de carga quer nas partículas MIP quer nas NIP. Estas partículas não apresentaram seletividade às moléculas em estudo.

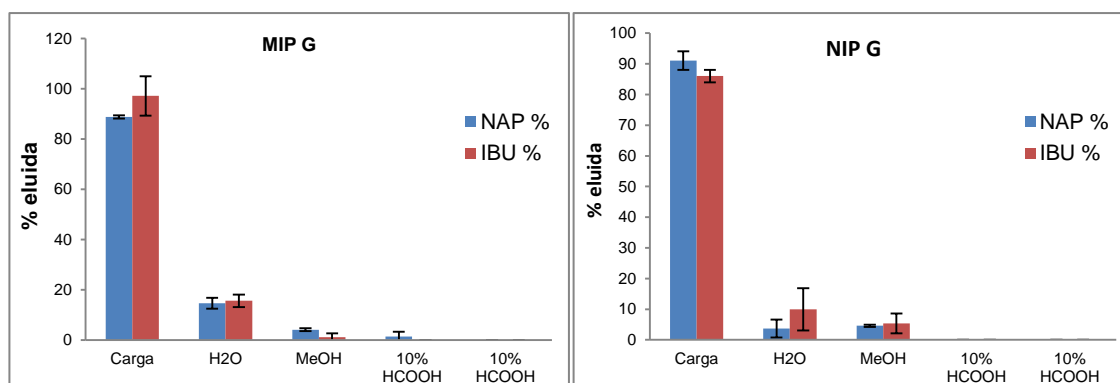


Figura 4.36. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP G, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Das partículas preparadas somente foram aplicadas em Lab-on-valve as partículas que demonstram seletividade (MIP A).

4.5.2 Outras partículas usadas no estudo

Analisando os resultados obtidos por SPE para as partículas MIP 525 (Figura 4.37) com carga em solução metanólica, observa-se a retenção completa da molécula NAP na alíquota carga e eluição de 20% da molécula de IBU. Durante a lavagem do leito adsorvente com a alíquota de H₂O apenas 1% da molécula de NAP é eluída, sendo 70% da molécula molde eluída com a alíquota de 10% de ácido fórmico. No entanto para a eluição completa foi necessário três alíquotas do eluente com maior força de eluição. Durante a alíquota de MeOH foi eluída 54% da molécula de IBU, a restante quantidade de molécula foi eluída com a primeira lavagem de ácido fórmico 10%. Com estes resultados é possível observar seletividade por parte destas partículas.

Tal como fizemos para as MIP A fomos estudar as alterações de retenção quando adicionávamos a solução carga em solução aquosa para posterior aplicação em amostras reais. Os resultados obtidos com a carga em solução aquosa demonstraram a retenção total das duas moléculas durante as alíquotas de carga e H₂O, tal como aconteceu com o MIP A. Durante a alíquota de MeOH 36% da molécula de IBU foi eluída e apenas 5% de molécula molde. Foram necessárias três alíquotas de 10% ácido fórmico para a eluição completa de molécula molde.

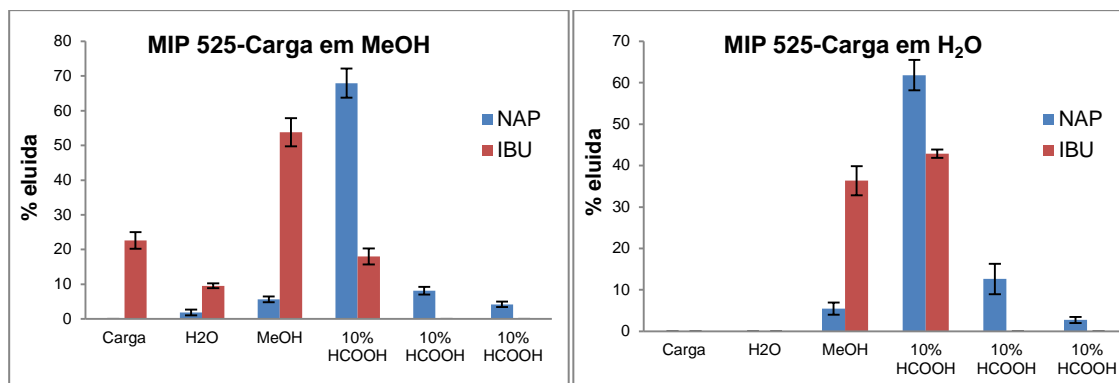


Figura 4.37. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP 525, carga em MeOH e em H₂O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Analisando os resultados do MIP/NIP PF (Figura 4.38) com solução carga em MeOH observou-se a retenção da molécula molde na alíquota de carga nas partículas MIP e a eluição de 2% no caso das partículas NIP. A molécula de IBU começou a ser eluída, tanto no NIP como no MIP na alíquota de carga. Os perfis de extração MIP/NIP foram muito similares, observou-se seletividade a molécula molde por parte das partículas, mas não houve diferenciação MIP/NIP.

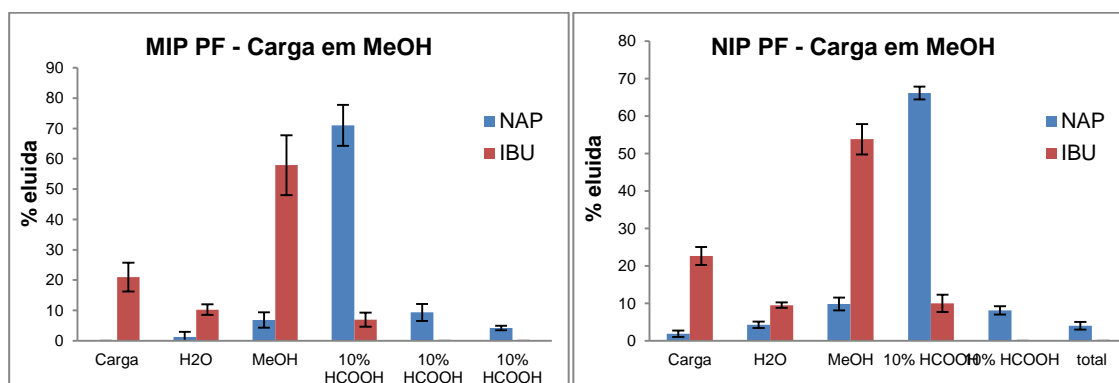


Figura 4.38. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP PF, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Nas partículas MIP/NIP PF (Figura 4.39) com solução carga em H₂O a molécula molde só começou a ser eluída com adição da alíquota de 10% ácido fórmico tanto para as partículas MIP como NIP. A molécula de IBU começou a ser eluída mais cedo, na alíquota de MeOH. Não se observou uma diferença MIP/NIP nas partículas.

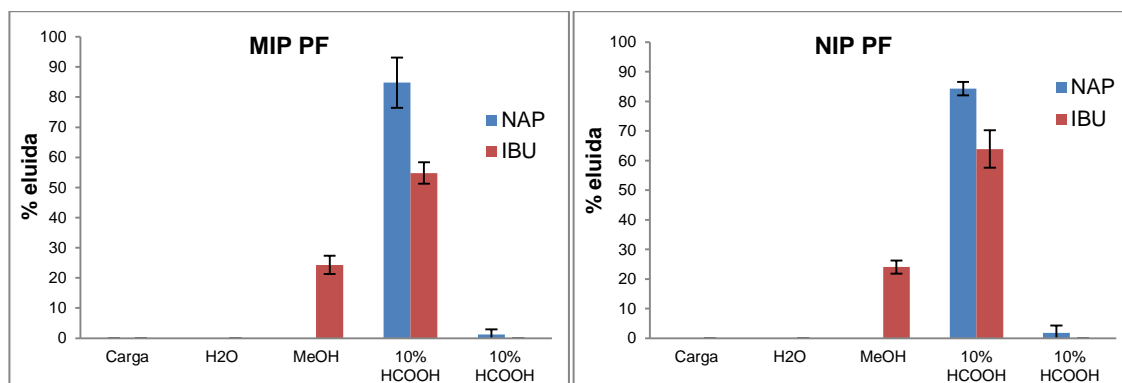


Figura 4.39. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP PF, carga em H₂O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Comparando os resultados obtidos com a carga em MeOH ou carga em solução aquosa nas partículas MIP A, MIP 525 e MIP PF observa-se que a adição da carga em MeOH nos permite melhores resultados na distinção de seletividade entre as duas moléculas em estudo.

Analisando os resultados de extração MIP/NIP 762 (Figura 4.40) observa-se a eluição quase completa das moléculas em estudo durante a passagem da alíquota de carga. Este material de impressão molecular não demonstra seletividade às moléculas nem diferença MIP/NIP.

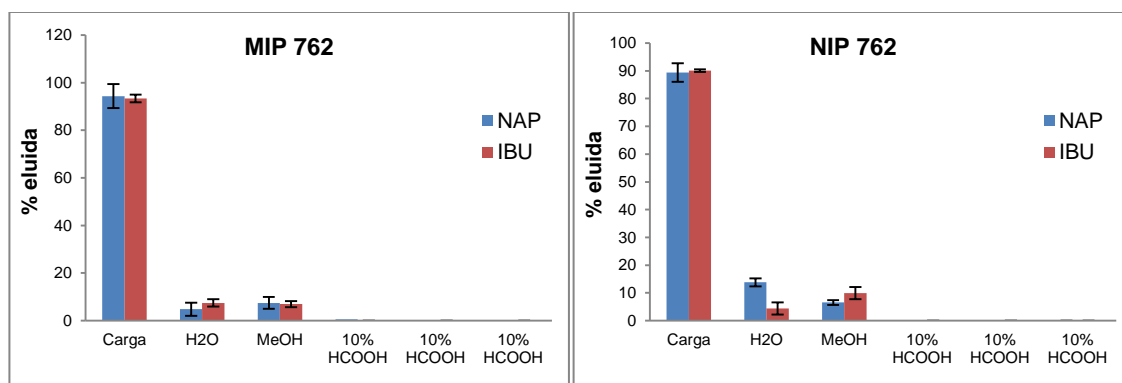


Figura 4.40. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP/NIP 762, carga em MeOH. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Analisando os resultados obtidos pelas partículas de MIP comercial (Figura 4.41) observou-se que a adição da solução carga em solvente orgânico não foi uma boa metodologia. Tal como era esperado, pelo que havia sido lido na informação que acompanhava as partículas, nestas condições os materiais não apresentam retenção, devendo ser usados em amostras aquosas.

Quando a carga foi feita em solução aquosa, estes demonstraram ser os materiais com maior capacidade de retenção, tanto para a molécula de NAP como para a molécula de IBU. Estas só começaram a ser eluídas com a adição da segunda alíquota de 10% ácido fórmico, não existiu distinção entre os fármacos, ficaram igualmente retidos. Deve lembrar-

se que estes materiais são usados para extração de vários fármacos anti-inflamatórios não esteroide.

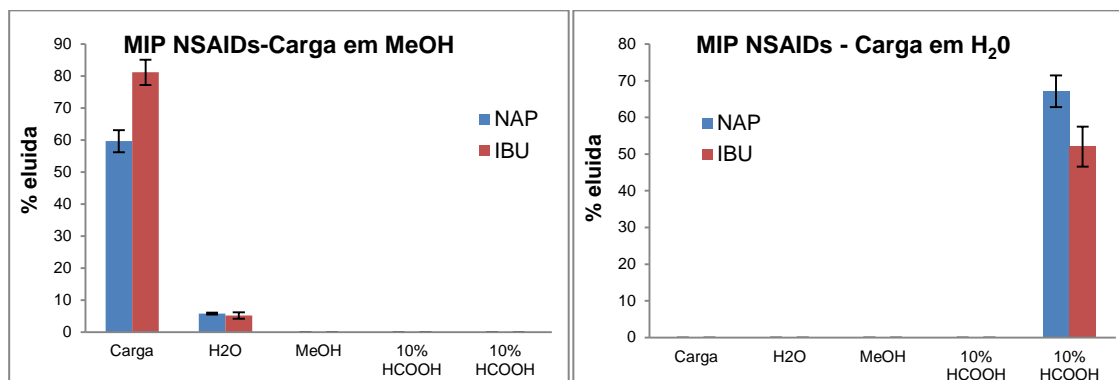


Figura 4.41. Representação gráfica dos resultados SPE do MIP NSAIDs, carga em MeOH e em H₂O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

As partículas OASISTM HLB (Figura 4.42) quando usadas em extração SPE com solução carga em MeOH obtiveram a retenção completa da molécula molde e eluição de 7% da molécula de IBU. Durante a alíquota de água foi eluído 7% de NAP e 27 % de IBU. A extração estendeu-se a uma segunda alíquota de 10% ácido fórmico, tanto para a extração de NAP como para a extração de IBU. Tal como aconteceu com as partículas MIP comerciais, com adição da carga em solução aquosa obtiveram-se melhores resultados de retenção e eluição para os fármacos em estudo.

Quando a carga foi realizada em H₂O, as partículas retiveram os fármacos em estudo até à sua eluição com 10% ácido fórmico. Na primeira alíquota de 10% ácido fórmico foi eluído 50% de IBU e 26% de molécula molde e na segunda alíquota 43% de IBU e 67% de NAP.

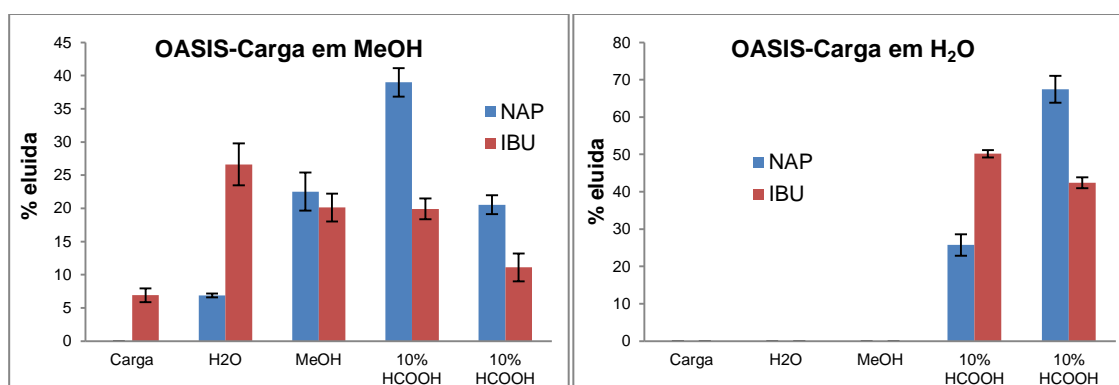


Figura 4.42. Representação gráfica dos resultados SPE das partículas OASISTM HLB, carga em MeOH e carga em H₂O. As barras de erro representam a amplitude (n=2).

Do grupo de partículas estudadas foram utilizadas em LOV as partículas MIP 525, MIP PF, MIP NSAIDs e as partículas OASISTM HLB.

Nas partículas estudadas em SPE que apresentaram seletividade à molécula molde, para melhor separação dos fármacos durante a extração poderão ser testadas soluções de capacidade de eluição intermédia entre MeOH e 10% de ácido fórmico.

4.6 Aplicação das partículas a técnica lab-on-valve

A solução carga na aplicação das partículas à técnica LOV foi sempre realizada em solução aquosa, com vista a futuras aplicações a amostras reais. Foi necessário também a alteração do solvente com maior força de eluição a utilizar, de forma a não danificar a peça monolítica LOV e os canais de transporte, passou-se utilizar ácido acético a 1% em metanol.

Foram aplicadas à técnica LOV as partículas MIP 525, MIP/NIP PF, MIP NSAIDs e as partículas OASISTM HLB. As partículas MIP A, MIP 525 e MIP/NIP PF foram partículas de impressão molecular preparadas em investigação e todas demonstraram seletividade à molécula molde. As partículas MIP A e MIP/NIP PF são partículas esféricas, enquanto as partículas MIP 525 são de forma irregular. Foram ainda aplicadas partículas de impressão molecular comerciais (esféricas) usadas na extração de um elevado número de fármacos anti-inflamatórios não esteróides e também partículas OASISTM HLB. Estas partículas demonstraram capacidade de retenção para ambos os fármacos.

O estudo das condições a utilizar no protocolo de LOV foi feito usando partículas comerciais OasisTM HLB. No entanto, quando se foi fazer a aplicação a outras partículas foram encontrados, por vezes, problemas no transporte das partículas, formação e rejeição das colunas e ainda problemas de pressão no sistema levando a perda de líquidos pelas portas adjacentes ao canal da coluna extratora. Tendo sido, necessário a sedimentação de algumas partículas como forma de ultrapassar alguns destes problemas. Foram sujeitas a um processo de sedimentação as partículas MIP A e as partículas MIP 525.

As colunas de extração em LOV foram empacotadas de forma automática, utilizando um passo de ressuspensão, antes da aspiração das partículas, para a fluidização das suspensões. As massas de microcoluna obtidas variaram consoante tipo de partículas utilizadas. A massa das colunas foi obtida por pesagem das partículas recolhidas no procedimento de descarte de partículas. A Tabela 4.5 resume a massa média das colunas extradoras para cada um dos tipos de partículas utilizadas.

Tabela 4.5. Massa das colunas extratoras usadas em LOV

Partículas	Massa da coluna (mg)	Desvio padrão relativo (RSD%, n de 5 a 8)
MIP A	7,1	21,1
MIP 525	21,5	17,2
MIP PF	14,7	14,9
NIP PF	14,2	14,1
MIP NSAIDS	12,3	15,5
OASIS™ HLB	13,5	17,0

A massa média das colunas variou entre os 7mg e 22 mg, dependendo como já foi dito, do tipo de partículas. Os valores de desvio padrão relativo obtidos foram relativamente elevados, não se tendo, no entanto, observado piores valores de desvio padrão relativo para as partículas de forma irregular (MIP 525), o que vai de encontro aos resultados obtidos por Oliveira et al^[73]. Uma possível forma de melhorar os valores de desvio padrão relativo passaria por estudos de suspensão/ressuspensão das partículas em diferentes solventes, com diferentes viscosidades.

Analisando os resultados MIP A (Figura 4.43) obtidos para extração usando a técnica de miniaturização LOV observou-se, como já tinha acontecido para a extração SPE com carga em solução aquosa, a retenção das moléculas na passagem da alíquota de carga e o início da eluição com a alíquota de MeOH. A molécula de IBU foi eluída na sua extensão máxima na primeira alíquota de ácido acético 1%. A molécula de NAP foi mais retida que a molécula análoga, pois foi necessário uma segunda alíquota de 1% ácido acético para a sua eluição em máxima extensão.

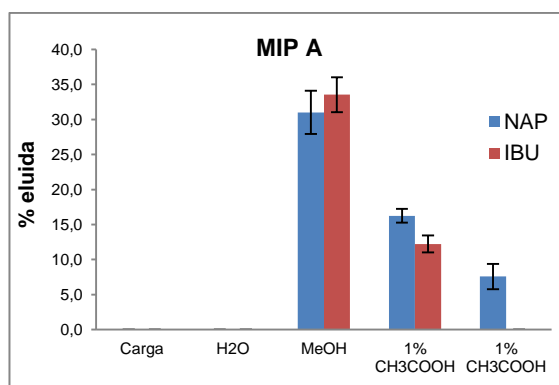


Figura 4.43. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP A. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).

Nos resultados de extração LOV das partículas MIP 252 (Figura 4.44), tal como aconteceu no MIP A as moléculas em estudo começaram a ser eluídas com a alíquota de MeOH, sendo a percentagem de eluição de IBU de 45% e a de eluição de NAP de 25%.

Para eluição em máxima extensão da molécula molde foi necessário uma segunda alíquota de solvente com maior força de eluição.

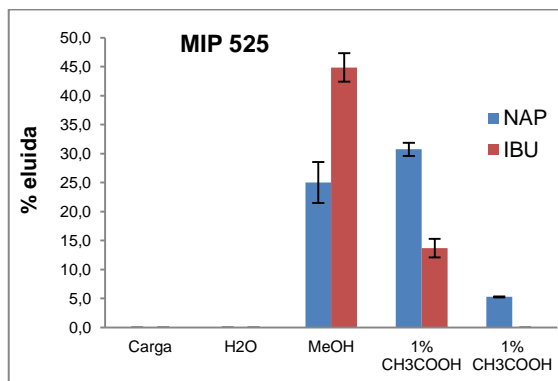


Figura 4.44. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP 525. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).

Nos resultados das partículas MIP PF (Figura 4.45) a retenção de molécula molde durante a alíquota de MeOH (89%) foi superior à observada nos MIP A e MIP 525, mostrando uma maior retenção da molécula de NAP nestas partículas. Sendo também neste caso, necessário uma segunda alíquota de 1% de ácido acético em MeOH para a sua eluição na máxima extensão. No entanto, não se observou uma diferença MIP e o NIP das partículas.

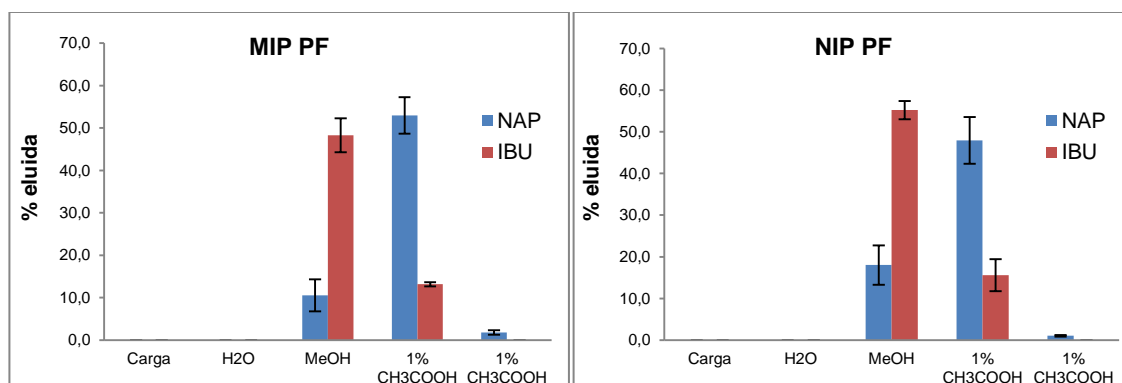


Figura 4.45. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP PF. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).

Analisando os resultados das partículas de impressão molecular comerciais, MIP NSAIDs, observa-se uma maior retenção da molécula de NAP. Ambas as moléculas começaram a ser eluídas na alíquota de MeOH, onde se deu a eluição completa da molécula de IBU. A molécula de NAP necessitou da passagem de duas alíquotas de 1% CH3COOH para a sua eluição em máxima extensão.

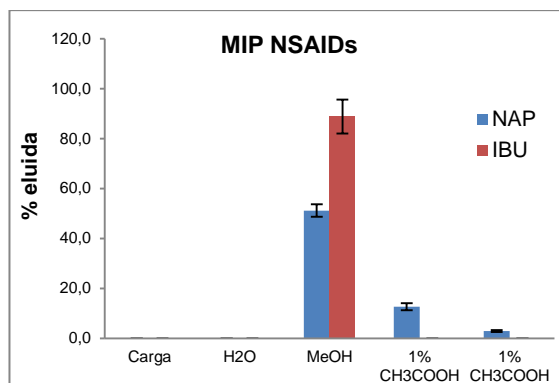


Figura 4.46. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas MIP NSAIDs. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).

As partículas comerciais OASISTM HLB, tal como aconteceu para as partículas anteriores a eluição dos fármacos só começou na alíquota de MeOH, onde o IBU foi eluído em máxima extensão. A eluição completa de NAP só foi conseguida com a adição de uma segunda alíquota de 1% ácido acético.

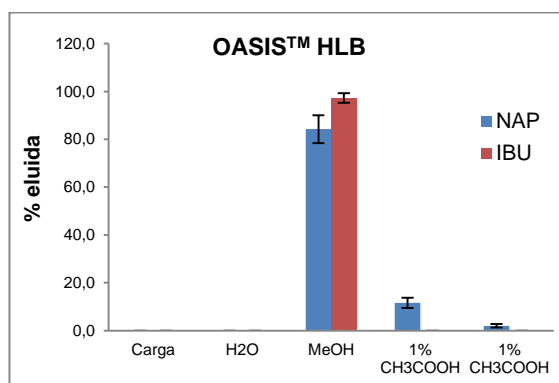


Figura 4.47. Representação gráfica dos resultados de extração em LOV das partículas OASISTM HLB. As barras de erro representam o desvio Padrão (n=3).

Na extração LOV, em todas as partículas se observou o início da eluição na passagem da alíquota de MeOH, sendo quase completa nos casos das partículas MIP NSAID's e nas partículas OASISTM HLB, o que não acontecia na eluição com MeOH durante a extração SPE. Fazendo o rácio volume de MeOH/quantidade de polímero observamos que são de ordens de grandeza díspares. Em extração SPE temos uma massa de 300 mg de polímero com um volume de 1000mL de MeOH dando uma razão de 3,3. Nas extrações LOV temos massas que variam entre as 6mg e as 15 mg de polímero para um volume de 600 mL de MeOH, dando razões que variam entre os 40 e os 100. Isto pode explicar a eluição precoce das moléculas em estudo quando comparando com os resultados obtidos pela extração SPE.

A recuperação dos fármacos utilizados no estudo LOV das partículas teve valores de recuperação, em geral baixos. Durante esta parte do estudo, o aparelho de HLPC e a coluna cromatográfica (uma coluna monolítica) usados foram diferentes dos usados durante o

estudo em SPE. Isto resultou em corridas cromatográficas de menor tempo, e em picos mais largos e com menores áreas, o que pode ter influenciado os resultados de recuperação. Também se deve ter em conta que apesar do processo de sedimentação ter diminuído a colmatção do “frit” e por consequência a fuga de líquidos, isto pode ter continuado a dar-se em menor escala.

Observou-se uma maior retenção dos fármacos com uso das partículas MIP A, MIP 525 e MIP PF quando comparando com as partículas comerciais. Nas partículas comerciais a eluição deu-se quase na sua extensão máxima com a passagem da alíquota de MeOH, enquanto nos materiais MIP A, MIP 525 e MIP PF isso só aconteceu com a passagem da primeira alíquota de 1% ácido acético.

A seletividade à molécula molde observada para as partículas MIP A em extração SPE deixou de ser observada quando usamos a técnica LOV. Nas partículas MP 525 e MIP/NIP PF, quando aplicadas a LOV continuou-se a observar a seletividade à molécula molde. Tal como aconteceu na extração SPE a separação, em extração dos fármacos poderá ser conseguida pelo uso de soluções intermédias entre MeOH e 1% ácido acético.

Capítulo 5

5 Considerações finais

O trabalho apresentado surge como uma abordagem ao desenvolvimento de novos materiais de impressão molecular em matriz sol-gel e aplicação numa técnica recente e pouco explorada de miniaturização de processos de extração em fase sólida designada LOV.

Os materiais de impressão molecular foram preparados através da combinação da tecnologia sol-gel com emulsões água em óleo.

A investigação iniciou-se pelo estudo de parâmetros de emulsão para a preparação de partículas de impressão molecular. Observou-se que o tamanho de partículas obtidas diminui com o aumento de concentração de tensioativo desde que esta fosse abaixo da concentração micelar crítica, com o aumento de volume da fase oleosa e com a utilização de ciclohexano no lugar de hexano.

Com os resultados obtidos por microscopia ótica das partículas de sílica escolheram-se, para a preparação das partículas de impressão, os parâmetros que permitiam a preparação de partículas com menor dispersão de tamanhos e com o tamanho médio de partícula maior dentro dos resultados de menor dispersão (óleo ciclohexano, razão de volumes 40 e concentração de tensioativo de 0,050 g/mL).

Foram preparados diversos materiais de impressão molecular com pequenas variações nos reagentes e razões de reagentes. Na preparação das partículas de impressão obtiveram-se rendimentos de 60% a 70% na preparação de partículas MIP de forma esférica e de 40% na preparação das partículas de forma irregular. Os tempos de preparação dos materiais foram longos, tempo de gelificação de 70 h a 160 h e tempo médio de lavagem por extração em soxhlet de 32 h.

A caracterização química dos polímeros preparados permitiu identificar o monómero funcional como o responsável pela coloração amarela das partículas e alteração química dos polímeros. Surgiam duas bandas adjacentes à banda característica do grupo imidazólio nos polímeros, após a sua utilização. Os resultados obtidos por SPE das partículas MIP A vieram reforçar esta ideia, ao se observar a deterioração da capacidade de retenção dos materiais. Esta alteração pode ter sido devido à utilização de ácido na extração, às condições de armazenamento do cartucho SPE ou ser característica destes géis a deterioração com o próprio tempo.

O estudo de avaliação do efeito de impressão molecular permitiu escolher os materiais a ser aplicados a técnica LOV. Dos materiais preparados, apenas as partículas MIP A demonstraram capacidade de retenção e seletividade à molécula molde. Foram testados outros materiais, partículas de impressão molecular preparados por outro membro do grupo de investigação, tendo o MIP 525 e o MIP/NIP PF demonstrado retenção e seletividade. Foram ainda testadas partículas comerciais, MIP NSAIDs e OASIST^M HLB,

estas partículas demonstraram capacidade de retenção para ambos os fármacos usados no estudo.

O estudo das condições a utilizar no protocolo de LOV foi feito usando partículas comerciais OasisTM HLB, no entanto quando se foi fazer a aplicação a outras partículas foram encontrados, por vezes, problemas no transporte das partículas, formação e rejeição das colunas e ainda problemas de pressão no sistema levando a perda de líquidos pelas portas adjacentes ao canal da coluna extratora. Utilizou-se a sedimentação de partículas como forma de ultrapassar alguns destes problemas.

As colunas de extração em LOV foram empacotadas de forma automática, utilizando um passo de ressuspensão, antes da aspiração das partículas, para a fluidização das suspensões. A massa média das microcolunas variou desde as 7 mg até as 22 mg consoante tipo de partículas utilizadas. Foram obtidos valores de desvio padrão relativo relativamente elevados (desde 14% a 21%) tanto para partículas de forma irregular como como para partículas de forma esférica.

Na extração em LOV observou-se a eluição precoce dos fármacos, devido ao rácio volume de MeOH/quantidade de polímero ter grandezas dispares quando comparados com o rácio da extração SPE e também baixos valores de recuperação dos fármacos em estudo. Houve uma maior retenção dos fármacos com uso das partículas MIP A, MIP 525 e MIP PF quando comparando com as partículas comerciais. A seletividade à molécula molde observada pelas partículas MIP A, MIP 525 e MIP/NIP PF em extração SPE continuou a ser visível em extração pela técnica LOV exceto no caso das partículas MIP A.

Assim, o trabalho desenvolvido deixa em aberto várias questões no que diz respeito à preparação e aplicação das partículas MIP sol-sol à técnica LOV. O trabalho futuro deverá passar por:

- Uma revisão dos processos de sol-gel e de emulsão, como forma de melhorar as características de impressão.
- Preparação de partículas de impressão molecular na forma esférica, usando na sua preparação a molécula molde na forma de sal de sódio.
- Tentar perceber qual a razão que leva a deterioração dos materiais de impressão molecular preparados.
- Tentar a obtenção de partículas de tamanhos maiores, ou pelo menos com menor número de partículas de pequenas dimensões, de forma a evitar o processo de colmatção do “frit” da coluna extratora.

Referências bibliográficas

- [1] Lin, C. I.; Joseph, A. K.; Chang, C. K.; Wang, Y. C.; Lee, Y. D., *Anal. Chim. Acta*, **481**, 175,(2003).
- [2] Ye, L.; Mosbach, K., *J. Inclusion Phenom. Macrocyclic Chem*, **41**, 107,(2001).
- [3] Andersson, L. I., *J. Chromat. B*, **745**, 3,(2000).
- [4] Cummins, W.; Duggan, P.; McLoughlin, P., *Anal. Chim. Acta*, **542**, 52-60,(2005).
- [5] Polyakov, M. V., *Zh. Fiz. Khim*, **2**, 799,((1931)).
- [6] Breinl, F.; Haurowitz, F., *Z. Physiol. Chem.*, **192**, 45,(1930).
- [7] Mudd, S., *J. Immunol.*, **23**, 423,(1932).
- [8] Dickey, F. H., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **35**, 227,((1949)).
- [9] Morrison, J. L.; Worsley, M.; Shaw, D. R.; Hodgson, G. W., *J. Chem.*, **37**, 1986,((1959)).
- [10] Kumar, A.; Gaurav; Malik, A. K.; Tewary, D. K.; Singh, B., *Anal. Chim. Acta*, **610**, 1,(2008).
- [11] Lord, H.; Pawliszyn, J., *J. Chromat. A*, **902**, 17,(2000).
- [12] Judit Tulla-Puche, F. A. Ed. *The Power of Functional Resins in Organic Synthesis*, Weinheim, (2008).
- [13] M. Komiyama., T. T., M.H. Asanuma, *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*, Wiley-VCH: (2003)
- [14] Alexander, C.; Andersson, H. S.; Andersson, L. I.; Ansell, R. J.; Kirsch, N.; Nicholls, I. A.; O'Mahony, J.; Whitcombe, M. J., *Journal of Molecular Recognition*, **19**, 106-180,(2006).
- [15] Whitcombe MJ, R. M., Vulfson EN *Separation for biotechnology* 3, Royal Society of Chemistry: Cambridge, (1994)
- [16] Yan, H.; Row, K., *International Journal of Molecular Sciences*, **7**, 155-178,(2006).
- [17] Cormack, P. A. G.; Elorza, A. Z., *Journal of Chromatography B*, **804**, 173-182,(2004).
- [18] Mingdi Yan, O. R. Ed. *Molecular Imprinted Material: Science and Technology*, Marcel Dekker: New York, (2005).
- [19] Silva, D. L. d., *Preparação de Partículas Esféricas de Sílica de Impressão Molecular*, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto (2010).
- [20] Mujahid, A.; Lieberzeit, P. A.; Dickert, F. L., *Materials*, **3**, 2196-2217,(2010).
- [21] Dickert, F. L.; Hayden, O., *Analytical Chemistry*, **74**, 1302-1306,(2002).
- [22] Lee, S.-C.; Chuang, F.-L.; Tsai, Y.-L.; Chen, H., *Journal of Polymer Research*, **17**, 737-744,(2010).
- [23] Dietz, C.; Sanz, J.; Cámara, C., *J. Chromat. A*, **1103**, 183,(2006).
- [24] <http://www.icmcb-bordeaux.cnrs.fr/duguet/postdea.htm>, In (Agosto, 2012).
- [25] Pierre, A. C., *Introduction to Sol-Gel Processing*, Kluwer Academics Publishers: Lyon, (1998)
- [26] Wang, Z.; Xiao, C.; Wu, C.; Han, H., *J. Chromat. A*, **893**, 157,(2000).
- [27] Ornelas, M. I. A. d., *Impressão molecular em técnicas de extração e microextração*, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto Porto, (2009).
- [28] Hench, L. L.; West, J. K., *Chemical Reviews*, **90**, 33-72,(1990).
- [29] Wright, J. D. S., N. A. J. M., *Sol-Gel Materials – Chemistry and Applications*, Taylor & Francis: (2001)
- [30] Brinker, J. C., Scherer, G. W., *Sol-Gel Science: The physics and chemistry of sol-gel processing*, Academic Press: (1990)
- [31] McDonagh, C.; Bowe, P.; Mongey, K.; MacCraith, B. D., *Journal of Non-Crystalline Solids*, **306**, 138-148,(2002).
- [32] Hegde, N.; Rao, A., *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **38**, 55-61,(2006).
- [33] Gupta, R.; Mozumdar, S.; Chaudhury, N. K., *Biosensors and Bioelectronics*, **21**, 549-556,(2005).
- [34] Sellergren, B. Ed. *Molecular Imprinted Polymer: Man-made mimics of antibodies and their applications in analytical chemistry*, Elsevier: Amsterdam, (2001).
- [35] Ye, L.; A. G. Cormack, P.; Mosbach, K., *Analytical Communications*, **36**, 35-38,(1999).
- [36] Ye, L.; Cormack, P. A. G.; Mosbach, K., *Analytica Chimica Acta*, **435**, 187-196,(2001).
- [37] Erbil, H. Y., *Vinyl acetate emulsion polymerization and copolymerization with acrylic monomers*, CRC Press: (2000)
- [38] Barbé, C.; Kong, L.; Finnie, K.; Calleja, S.; Hanna, J.; Drabarek, E.; Cassidy, D.; Blackford, M., *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **46**, 393-409,(2008).
- [39] Fanun, M., *J. Disper. Sci. Technol.*, **28**, 1244-1253,(2007).
- [40] Szekeres, E.; Acosta, E.; Sabatini, D., and Harwell, J. H., *J. Colloid Interf. Sci.*, **294**, 222-233,(2006).

- [41] Fanun, M. Ed. *Microemulsions: Properties and Applications, part of Surfactants Science Series*, CRC Press: Florida, (2009).
- [42] Lee, C.-w.; Yi, S.-S.; Kim, J.; Lee, Y.-S.; Kim, B.-G., *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **11**, 277-281,(2006).
- [43] Rosen, M. J., *Base Geral - Registo Bibliográfico [000064854]*, Wiley Interscience: (2004)
- [44] Becher, P., *Encyclopedia of emulsion technology*, In Marcel Dekker: New York, (1983); Vol. 1º.
- [45] Chang, C.-L.; Fogler, H. S., *Langmuir*, **13**, 3295-3307,(1997).
- [46] Sjoblom, J., *Emulsions and emulsion stability*, CRC Press: (2006)
- [47] Baggiani, C.; Baravalle, P.; Anfossi, L.; Tozzi, C., *Analytica Chimica Acta*, **542**, 125-134,(2005).
- [48] Chen, X.-W.; Wang, J.-H., *Analytica Chimica Acta*, **602**, 173-180,(2007).
- [49] Chen, D.-M.; Fu, Q.; Du, W.; Sun, S.-J.; Huang, P.; Chang, C., *Journal of Pharmaceutical Analysis*, **1**, 26-31,(2011).
- [50] *The Merck Index*, Merck & Co. Inc.: (1989)
- [51] Adhoum, N.; Monser, L.; Toumi, M.; Boujlel, K., *Analytica Chimica Acta*, **495**, 69-75,(2003).
- [52] He, C.; Long, Y.; Pan, J.; Li, K.; Liu, F., *Talanta*, **74**, 1126-1131,(2008).
- [53] Migliorini, M.; Donato, R.; Benvegnú, M.; Gonçalves, R.; Schrekker, H., *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, **48**, 272-276,(2008).
- [54] Lee, B.; Im, H.-J.; Luo, H.; Hagaman, E. W.; Dai, S., *Langmuir*, **21**, 5372-5376,(2005).
- [55] Cellesi, F.; Tirelli, N., *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, **288**, 52-61,(2006).
- [56] Highton, F., *Ibuprofen: A Critical Bibliographic Review*, CRC Press: (1999)
- [57] Mitra, S. Ed. *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, (2003).
- [58] Almeida C.; Rosário P.; Serôdio P.; Nogueira J. M. F.; Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 69-77, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química* 2005).
- [59] RUZICKA, J., ; HANSEN, E., *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145-157,(1975).
- [60] HANSEN, E., WANG, J. , *Anal. Lett.*, **37**, 345-359,(2004).
- [61] Trojanowicz, M. Ed. *Advances in Flow Analysis*, Wiley-VCH: Weinheim, (2008).
- [62] Ruzicka, J.; Marshall, G. D., *Analytica Chimica Acta*, **237**, 329-343,(1990).
- [63] Ruzicka, J.; Hansen, E. H., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **17**, 69-73,(1998).
- [64] Oliveira, H. M. R. C., *Automatic methodologies for environmentally friendly processing of samples and coupling to liquid chromatography*, Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto Porto, (2010).
- [65] Luque de Castro, M. D.; Ruiz-Jiménez, J.; Pérez-Serradilla, J. A., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**, 118-126,(2008).
- [66] Ruzicka, J., *Analyst*, **125**, 1053-1060,(2000).
- [67] Vidotti, E. C.; Almeida, V. C.; Oliveira, C. C., *Talanta*, **64**, 993-999,(2004).
- [68] Miro, M.; Hartwell, S. K.; Jakmunee, J.; Grudpan, K.; Hansen, E. H., *ChemInform*, **40**, no-no,(2009).
- [69] Ruzicka, J.; Scampavia, L., *Analytical Chemistry*, **71**, 257A-263A,(1999).
- [70] Miró, M.; Hartwell, S. K.; Jakmunee, J.; Grudpan, K.; Hansen, E. H., *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **27**, 749-761,(2008).
- [71] Hansen, E. H.; Miró, M., *Applied Spectroscopy Reviews*, **43**, 335-357,(2008).
- [72] Wang, J.; Hansen, E. H.; Miró, M., *Analytica Chimica Acta*, **499**, 139-147,(2003).
- [73] Oliveira, H. M.; Miró, M.; Segundo, M. A.; Lima, J. L. F. C., *Talanta*, **84**, 846-852,(2011).
- [74] Stubenrauch, C., *Microemulsions Background, New Concepts, Applications and Perspectives*, Wiley: (2009)
- [75] SupelMIP™ SPE – NSAIDs In Sigma-Aldrich Ed. (2009).
- [76] OASIS™ HLB Sample extracion products, In Waters Ed. (1998).